

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Mise au point d'une Biochip athérosclérose en modèle murin

Demollin, Patricia

*Award date:*  
2000

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



---

**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**Mise au point d'une Biochip  
«athérosclérose» en modèle murin**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
licencié en Sciences biologiques**

Patricia Demollin

Juin 2000



**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix**  
**FACULTE DES SCIENCES**  
Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR  
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20  
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**Mise au point d'une Biochip**  
**« athérosclérose » en modèle murin**

DEMOLLIN Patricia

Résumé

L'athérosclérose, maladie caractérisée par l'épaississement local de la paroi des artères de gros calibre, est la cause d'environ 50 % des décès aux USA. Ce processus dynamique fait intervenir les cellules endothéliales, les monocytes et les cellules musculaires lisses.

Les mécanismes moléculaires à la base de la maladie ne sont pas encore complètement élucidés, mais on sait que les lipoprotéines athérogènes (LDL et VLDL), ainsi qu'une blessure endothéliale locale, jouent un rôle majeur. Ces deux facteurs contribuent à des stades précoces de la maladie, à modifier le comportement des cellules endothéliales, y compris au niveau de leur expression. Pour étudier ces changements d'expression, nous avons réalisé une chip expérimentale préliminaire « athérosclérose », à faible densité. Nous avons choisi de travailler en modèle murin car les souris transgéniques et knock-out sont des modèles in vivo de plus en plus utilisés en recherche dans le domaine de l'athérosclérose. En outre, il existe plusieurs lignées de cellules endothéliales murines qui, incubées en présence de lipoprotéines athérogènes, telles les VLDL, s'activent. Pour réaliser cette chip, une vingtaine de séquences de messagers codant pour des protéines relevantes dans le cadre de l'athérogenèse, ont été sélectionnées. Des trappeurs correspondants ont été générés par RT-PCR et fixés sur verre. L'hybridation a été optimisée avec des cibles pures biotinylées, également générées par PCR. Enfin, nous avons testé la biochip avec 12 trappeurs, sur de l'ARN total extrait de cellules endothéliales soumises ou non à des  $\beta$ -VLDL athérogènes.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2000

**Promoteur :** J. Remacle

**Co-promoteur :** M. Raes

Je remercie le Professeur José remacle de m'avoir accueillie dans son laboratoire ainsi que Martine Raes pour sa compétence professionnelle qui m'a apporté beaucoup durant ces quelques mois.

Je tiens à remercier Monsieur Paul Holvoet de m'avoir fournit les cellules indispensables à mon travail.

un merci tout particulier à « Zaza » pour son dynamisme , sa bonne humeur, et toute ses petites choses qui m'ont fait rire. Merci pour tous tes conseils, ton aide et tout et tout.

Merci à Anne-France et Jeremy pour leur aide, les bons moments passés ensemble, et les petites bouffes bien grasses sur le temps de midi

Merci à Anne-Catherine ,Martine, et Noëlle de m 'avoir aidé et conseillé tout au long de ce mémoire.

Merci à toute l'équipe des biochips : Nathalie Z. pour son aide, ses conseils et sa gentillesse ; Françoise et Valérie pour leur disponibilité et leur aide ; Sandrine pour les corrections ; Mumu, Pierre-Emmanuel, Nathalie C..

Merci à Gaëtan, Denis et Manu pour leur bonne humeur et leurs petites blagues... Merci à Jean-Jean pour son aide et sa sympathie.

Merci à toutes les personnes du labo pour votre accueil et votre sympathie.

Merci à Sarah pour tous les moments agréables que l'on a passé ensemble durant ces deux années.

Merci aux autres mémorants, Amélie, Sébastien, Marielle et Stéphanie pour leur sympathie. C'était chouette de travailler avec vous.

Merci à Benoît de m'avoir toujours encouragée dans les moments difficiles . Tu as toujours su ce qu'il fallait me dire pour me remonter le moral.

Un merci tout particulier à Yannik pour sa présence et sa gentillesse durant ces quelques mois, pour les fous rires, les restos et pour tout ce qui fait qu'on se sentait simplement bien.

Enfin, je tiens à dédier ce mémoire à mes parents, sans qui je n'aurais pu vivre cette belle aventure. Merci de m'avoir encourager durant toutes ces années et de m'avoir toujours fait confiance.



## Abréviations

ACAT	Acyl CoA acyl transférase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
APO	Apoprotéine
ARNm	Acide ribonucléique messenger
B1	Buffer one
bp	Paires de bases
CETP	Cholestéryl ester transfer protein
CML	Cellule musculaire lisse
CMV	Cytomégalovirus
COX	Cyclooxygénase
dATP	Déoxy-adénosine triphosphate
dCTP	Déoxy-cytosine triphosphate
dGTP	Déoxy-guanine triphosphate
dNTP	Déoxynucléoside triphosphate
dUTP	Déoxy-uridine triphosphate
D.O	Densité optique
E .coli	Escherichia coli
FGF	Fibroblast growth factor
HDL	High density lipoprotein
HIV	Human Immunodeficiency Virus
ICAM	Intercellular cell adhesion molecule
IDL	Intermediate density lipoprotein
Kb	Kilobase
LCAT	Lecithine cholesterol acyl transferase
LDL	Low density lipoprotein
MM-LDL	LDL moyennement modifiés
mm-LDL	LDL faiblement modifiés
NFκB	Nuclear factor κB
Ox-LDL	LDL oxydés
PCR	Polymerase Chain Reaction
PBS	Phosphate Buffer Saline
PDGF	Platelet derived growth factor

PKC	Protéine Kinase C
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SPLA2	PLA2 sécrétée
Taq Pol	Polymérase des <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	tris borate EDTA
Tm	température de melting
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VLDL	Very low density lipoprotein

## **A. Introduction**

### **1. L'athérosclérose**

#### 1.1. Lésions typiques liées à l'athérosclérose

*1.1.1. Rappel sur les artères*

*1.1.2. Lésions typiques liées à l'athérosclérose et évolution*

#### 1.2. Les lipoprotéines et leurs récepteurs

#### 1.3. Modèles actuels hypothétiques impliquant la maladie

#### 1.4. Gènes potentiellement impliqués dans l'athérosclérose

### **2. Techniques utilisées dans l'étude de l'expression génique**

### **3. Les biochips**

#### 3.1. Fonction générale de la biochip

#### 3.2. Etapes de construction d'une biochip

*3.2.1. Chimie de couplage des ADN de capture*

*3.2.2. Mode d'adressage de l'ADN capteur*

#### 3.3. Détection des biochips

#### 3.4. Applications

*3.4.1. Identification de mutations*

*3.4.2. Diagnostic de maladies*

*3.4.3. Développements pharmaceutiques*

#### 3.5. Intérêt de la biochip dans le cadre de ce mémoire

### **4. Contexte du travail**

<b>B. Matériels et méthodes</b>
---------------------------------

**1. Culture cellulaire**

1.1. Matériel

1.2. Méthode

**2. Stimulation des cellules b-END5 à l'interleukine-1**

2.1. Matériel

2.2. Méthode

**3. Extraction d'ARN total des cellules en culture**

3.1. Matériel

3.2. Méthode

**4. Purification d'ARN messager à partir d'ARN total**

4.1. Principe

4.2. Matériel

4.3. Méthode

**5. Réactions de polymérase en chaîne (PCR)**

5.1. Principe

5.2. Matériel



5.3. Méthode

**6. Transcriptions inverse et PCR (RT-PCR)**

6.1. Principe

6.2. Matériel

6.3. Méthode

**7. Transcription inverse (RT)**

7.1. Principe

7.2. Matériel

7.3. Méthode

**8. Electrophorèse sur gel d'agarose**

8.1. Principe

8.2. Matériel

8.3. Méthode

**9. Purification des produits PCR**

9.1. Purification par le Kit High Pure PCR Product  
Purification

*9.1.1. Principe*

*9.1.2. Matériel*

*9.1.3. Méthode*

9.2. Purification des produits PCR par Qiaquick8

*9.2.1. Principe*



9.2.2. *Matériel*

9.2.3. *Méthode*

9.3. Purification d'ADN à partir du gel d'agarose

9.3.1. *Principe*

9.3.2. *Matériel*

9.3.3. *Méthode*

## **10. Clonage des amplicons produits par RT-PCR**

10.1. Principe

10.2. Ligation des inserts dans le plasmide

10.3. Préparation des bactéries compétentes

10.3.1. *Matériel*

10.3.2. *Méthode*

10.4. Transformation des bactéries par la méthode du choc thermique

## **11. Mini-préparation d'ADN plasmidique**

11.1. Matériel

11.2. Méthode

## **12. Vérification de la construction du plasmide**

12.1. Restriction par EcoR1

12.1.1. *Matériel*

12.1.2. *Méthode*

12.2. Séquençage des plasmides

12.2.1. *Principe*

*12.2.2. Matériel*

*12.2.3. Méthode*

12.3. PCR interne ou nested PCR pour l'obtention de trappeurs aminés

*12.3.1. Matériel*

*12.3.2. Méthode*

12.4. PCR interne ou nested PCR pour l'obtention de cibles biotinylées

*12.4.1. Matériel*

*12.4.2. Méthode*

### **13. Fixation des trappeurs sur la biochip**

13.1. Principe

13.2. Matériel

13.3. Méthode

*13.3.1. Préparation de la solution de fixation*

*13.3.2. Fixation proprement dite*

*13.3.3. Lavage*

### **14. Hybridation d'ADN sur la biochip**

14.1. Principe

14.2. Matériel

14.3. Méthode

### **15. Détection des biochips en colorimétrie**

15.1. Principe

15.2. Matériel

15.3. Méthode

<b>C. Résultats et discussions</b>
------------------------------------

**I. Mise en œuvre de la chip "athérosclérose" en modèle Murin**

**1. Recherches préliminaires en banques de données**

1.1. Recherche des séquences théoriques des gènes d'intérêt

1.2. Recherche des amorces

**2. Extraction d'ARN total de cellules en culture**

**3. Production d'amplicons d'environ 600 pb par RT-PCR**

3.1. RT-PCR

3.2. Purification et quantification sur gel des produits de RT-PCR

3.3. Amplification par PCR des amplicons de 600pb

3.4. Clonage des amplicons

3.5. Vérification du clonage

**4. Optimisation de l'étape d'hybridation avec des trappeurs cibles sur VCAM-1 et ICAM-1**

4.1. Amplification de trappeurs de différentes tailles par PCR

4.2. Fixation des ADN trappeurs de différentes tailles

4.3. Hybridation sur les damiers portant des trappeurs de différentes tailles

**5. Production d'une chip à 12 trappeurs**

5.1. Production des trappeurs de 400 pb pour les 10 autres gènes

5.2. Fabrication d'un damier portant les trappeurs de 400 pb pour 12 gènes

5.3. Production de cibles biotinylées utilisables en hybridation

5.4. Mesure de la spécificité d'hybridation sur les damiers du point 1.11.

**II. Utilisation de la chip**

<b>D. Conclusions et perspectives</b>
---------------------------------------

<b>E. Bibliographie</b>
-------------------------



# **Introduction**

# 1. L'athérosclérose

## 1.1 Lésions typiques liées à l'athérosclérose

### 1.1.1 Rappel sur les artères

Avant d'exposer la description et l'évolution des lésions athérosclérotiques, rappelons la structure générale d'une artère. Les artères, constituant une partie du système vasculaire, permettent le transport du sang au cœur vers les organes. Les artères sont classées suivant leur diamètre. Des plus petites aux plus grandes, on trouve les artérioles, les artères musculaires (de moyen calibre) et les artères élastiques (de large calibre). Ce sont ces dernières qui sont le plus souvent impliquées dans les phénomènes d'athérosclérose. La structure de base commune à toutes les artères comprend 3 couches (Collins, 1996) avec les caractéristiques suivantes (Fig.I.1) :

- l'intima est la mince couche interne de la paroi vasculaire. Elle comporte :
  - un endothélium constitué d'une assise de cellules endothéliales très aplaties , jointives et allongées suivant le flux sanguin
  - une lame basale sur laquelle repose l'endothélium
  - une couche subendothéliale comportant des fibroblastes, des fibres élastiques, des fibres de collagène et, dans certaines artères, des cellules musculaires lisses. Leur contraction permet la réduction de la lumière vasculaire pour pouvoir réduire le débit sanguin.
- la média est la couche intermédiaire de la paroi vasculaire. Elle est constituée en majorité de cellules musculaires lisses. Son épaisseur varie en fonction du calibre du vaisseau. Dans les artères élastiques, les cellules musculaires lisses s'intercalent entre les lames élastiques quasi continues. Dans l'aorte, une artère dite élastique, on trouve jusqu'à 50 de ces lames élastiques. Dans les artères musculaires, on trouve entre 10 à 40 couches de cellules musculaires lisses. Le tissu élastique est réduit à quelques fibres très fines mais il existe cependant deux lames élastiques épaisses : la limitante élastique interne, située entre la média et l'intima, et la limitante élastique externe, entre la média et l'adventice.
- l'adventice est la couche la plus externe de la paroi vasculaire. Elle est constituée de fibroblastes et de matrice extracellulaire, de fibres nerveuses, de vaisseaux et de globules blancs (lymphocytes, macrophages et plasmocytes).



### 1.1.2 Lésions typiques liées à l'athérosclérose et évolution

L'athérosclérose est une maladie qui affecte les artères de gros calibre (artères élastiques et musculaires), conduisant à l'épaississement local des parois des artères, avec obstruction progressive de leur lumière. Ceci a pour conséquences : ischémie et nécrose des tissus mal vascularisés, anévrismes cérébraux et infarctus du myocarde, par exemple. Elle est donc caractérisée par une diminution du diamètre de la lumière artérielle, dû à l'accumulation de cholestérol dans la paroi. C'est une maladie typique des sociétés occidentales et elle est la cause d'environ 50 % des décès aux USA.

L'apparition des lésions résulte de la combinaison de plusieurs facteurs de risques déterminés lors d'études épidémiologiques. Ces facteurs de risque peuvent être classés en différents groupes (Stevens et Lowe, 1997) :

- risques constitutionnels :

âge

sexe (les hommes étant plus touchés que les femmes)

antécédents familiaux

anomalies génétiques

- risques élevés :

hyperlipidémie

hypertension

diabète

tabagisme

- risques légers :

manque d'exercice physique

obésité

stress

Il s'agit d'un processus dynamique (Fig.I.2) débutant par une blessure au niveau de l'endothélium, causée par exemple par des forces hémodynamiques ou par infection microbienne, ce qui active les cellules endothéliales. Celles-ci deviennent « collantes » pour les leucocytes et perdent leur cohésion entre elles ; cela permet l'entrée au niveau de la subendothéliale des monocytes circulants qui se transforment alors en macrophages et des lipoprotéines plasmatiques dont les low density lipoprotein (LDL ou mauvais cholestérol). Dans la subendothéliale, ces LDL s'oxydèrent, par manque d'antioxydants. Les macrophages, via leurs récepteurs « scavenger » vont alors internaliser les low density lipoprotein oxydées (oxLDL). Ces macrophages chargés de cholestérol portent le nom de cellules spumeuses et provoquent la formation d'une strie lipidique ou « fatty streak » (Collins, 1996).



Nous sommes dans un foyer inflammatoire et la cellule endothéliale activée va produire également des cytokines (IL-1, TNF,...) et des chémokines (IL-8, MCP-1,...) exacerbant le processus décrit ci-dessus ainsi que des facteurs de croissance (PDGF, FGF,...) affectant les cellules musculaires lisses de la média, qui vont alors proliférer et migrer de la média vers l'intima. Nous avons donc un phénomène d'amplification qui aboutit à la formation d'une plaque fibreuse déformant l'endothélium. On distingue au niveau de cette plaque d'athérome un cœur dans lequel on trouve des cristaux de cholestérol, des cellules spumeuses et des débris cellulaires musculaires et de matrice extracellulaire. Tout ceci peut se calcifier et se néovasculariser, ce qui aboutira, en cas de fissures, à la formation d'un thrombus obturant les vaisseaux, provoquant ainsi un infarctus.

Dans l'athérosclérose, 3 types cellulaires jouent donc un rôle capital : les cellules endothéliales, les monocytes se transformant en macrophages accumulant le cholestérol pour donner des cellules spumeuses, mais aussi des cellules musculaires lisses qui par prolifération excessive, contribuent également à l'évolution de l'athérome. Certaines cellules musculaires lisses se différencient également en cellules spumeuses, accumulant le cholestérol.

### **1.2 Les lipoprotéines et leurs récepteurs**

Il a été démontré que le développement des lésions athérosclérotiques était fortement lié au métabolisme du cholestérol et à son transport. Les lésions vasculaires apparaissent suite à une accumulation de ce cholestérol en particulier au niveau de l'intima des artères élastiques.

Le cholestérol n'existe pas sous forme libre dans la circulation sanguine ; il est toujours lié à d'autres lipides et à des protéines, les apoprotéines (APO) afin de permettre son transport. Les apoprotéines structurent les lipoprotéines, mais elles interviennent également dans la reconnaissance des lipoprotéines aux récepteurs situés en surface des cellules de l'organisme et comme cofacteur d'enzymes impliqués dans la transformation des lipoprotéines.

Les lipoprotéines sont classées suivant :

- leur densité
- leur poids moléculaire
- leur mobilité électrophorétique
- le rapport protéines/lipides
- la composition en lipides
- les apoprotéines associées

En général, on les distingue d'après leur densité, en quatre grandes catégories (Tableau I.1). Elles sont toutes impliquées dans le transport du cholestérol et il y a un dynamisme entre ces différentes lipoprotéines.

On distingue deux voies de transport du cholestérol : la voie endogène et la voie exogène (Fig.I.3) (Voet et Voet,1998). Lors de son arrivée dans



l'intestin, le cholestérol provenant des graisses alimentaires (voie exogène), est capté par les entérocytes où il subit une estérification réalisée par la lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT). Il s'associe ensuite à des triglycérides, des phospholipides et à l'apoprotéine B-48 pour former les chylomicrons. Ces particules peuvent alors circuler dans le sang et dans la lymphe et ont généralement un rôle de transport des triglycérides. Elles peuvent subir l'action de la lipoprotéine lipase (LPL) qui va dégrader les triglycérides. Cette LPL est activée par l'APO C2, cédée par les HDL (high density lipoprotein). Ces chylomicrons vont alors devenir des chylomicrons résiduels qui vont acquérir l'APO E à partir des HDL et qui seront capturés par le foie via le récepteur à l'APO E pour y être dégradés. Le cholestérol se trouvant dans le foie est soit stocké, soit dégradé et éliminé sous forme de sels biliaires via la bile sécrétée dans l'intestin, soit réexporté avec les triglycérides dans les VLDL (very low density lipoprotein), qui vont être libérées dans le sang.

Les VLDL contiennent l'APO B-100, l'APO E et plusieurs APO C, ainsi qu'une majorité de triglycérides. Ces VLDL vont aussi subir l'action de la LPL et être transformées en IDL (intermediate density lipoprotein) ou VLDL résiduelles. Ces IDL peuvent être soit recyclées en partie au niveau du foie ou soit être transformées, grâce à une lipase hépatique, en LDL (low density lipoprotein).

Les LDL contiennent l'APO B-100 et une majorité de cholestérol, d'où leur importance dans l'athérosclérose. Elles circulent dans le sang et interagissent avec des récepteurs à haute affinité qui reconnaissent l'APO B-100, situés sur les hépatocytes ainsi que sur les cellules musculaires lisses et les fibroblastes. Ce récepteur reconnaît l'APO B-100, mais aussi l'APO E. Il est appelé récepteur aux LDL natives. L'interaction des LDL avec leur récepteur initie une endocytose suivie par le catabolisme des LDL. Après leur dégradation, le récepteur est recyclé et le cholestérol est, soit recyclé, soit stocké sous forme d'ester de cholestérol.

L'expression de ce récepteur est régulé de façon très stricte par le taux de cholestérol intracellulaire, ce qui permet aux cellules périphériques de ne recevoir que la quantité de cholestérol nécessaire par exemple à leur synthèse membranaire ou à la production de stéroïdes.

Les LDL sont très sensibles à l'oxydation et elles peuvent s'oxyder par exemple par simple incubation en présence de cellules, dont les cellules endothéliales (Demuth et al, 1995). Les LDL oxydées sont caractérisées par :

- une augmentation de leur densité et de leur charge négative nette
- une hydrolyse de leurs lécithines en lysolécithines avec libération et peroxydation des acides gras insaturés en position 2.
- une diminution du rapport lipides/protéines
- une oxydation du cholestérol
- un clivage au niveau de leur apolipoprotéine B-100



En fait, les LDL subissent un processus d'oxydation progressif : elles se transforment tout d'abord en LDL faiblement modifiées (mm-LDL ou minimally modified-LDL) puis en LDL moyennement modifiées (MM-LDL ou Midly modified-LDL) qui ne sont modifiées qu'au niveau du contenu lipidique. Ces LDL sont encore reconnues par le récepteur aux LDL natives. Ensuite, elles deviennent des LDL oxydées qui sont modifiées à la fois au niveau du contenu lipidique et au niveau de l'APO B-100. Ces LDL ne sont alors plus reconnues par le récepteur aux LDL natives, mais par les récepteurs dits « scavenger » exprimés en particulier sur les macrophages et les cellules musculaires lisses.

Les récepteurs scavenger n'étant pas régulés par le taux de cholestérol intracellulaire, c'est principalement par leur intermédiaire que l'accumulation du cholestérol au sein des macrophages conduit à la formation de cellules spumeuses (Demuth et al, 1995), qui contribuent comme nous l'avons vu à la formation des lésions athérosclérotiques .

Quant aux HDL, elles contiennent l'APOAI et l'APOAII et sont produites au niveau du foie et de l'intestin. L'APOAI est un cofacteur pour la LCAT et va donc permettre l'estérification du cholestérol. La HDL cède ensuite, grâce à la cholesteryl ester transferase protein (CETP), le cholestérol estérifié aux LDL qui le ramènent au foie. Ces HDL interagissent donc avec les cellules pour épurer l'excès de cholestérol des tissus périphériques et permettent l'évacuation de ce cholestérol en excès vers le foie via les LDL.

Nous pouvons dès lors regrouper ces lipoprotéines en deux grandes catégories :

- les lipoprotéines athérogènes : LDL, VLDL, IDL  
Il a été démontré que lorsqu'il y a des concentrations élevées en LDL, le risque de maladies cardiovasculaires est augmenté.
- Les lipoprotéines protectrices : HDL  
Une forte concentration en HDL, dépendant elle-même de l'APO AI disponible, diminue le risque de maladies cardiovasculaires.

Cette classification est le résultat d'observations épidémiologiques et cliniques.

Il est à remarquer aussi que chez certains animaux, tels que la souris, ce sont les VLDL qui sont surtout impliquées dans l'athérogenèse et non les LDL, comme c'est le cas pour les humains.

### **1.3 Modèles actuels hypothétiques impliquant la maladie**

Plusieurs hypothèses ont été proposées afin d'expliquer la maladie (Tableau I.2). Ces hypothèses sont loin d'être exclusives les unes des autres. Néanmoins , dans la plupart des théories proposées, on s'accorde pour dire que la blessure endothéliale, par exemple au niveau des points de bifurcation où les



forces de cisaillement sont importantes, constituerait la première étape du processus. Cette blessure endothéliale entraîne l'activation des cellules et mène à des changements importants tels que la perte de l'intégrité vasculaire, l'expression des molécules d'adhésion, la production de cytokines, chémokines et des facteurs de croissance, des changements prothrombiques ainsi qu'une surexpression des molécules HLA du complexe CMH (complexe majeur d'histocompatibilité). En cas d'excès de LDL plasmatiques, la blessure endothéliale favorise l'accumulation de LDL dans la subendothéliale où elles s'oxyderaient progressivement. Ces LDL modifiées s'accumulent dans les cellules spumeuses, mais affectent également le comportement des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses et des monocytes/macrophages (Kita et al., 1999).

### **1.4 Gènes potentiellement impliqués dans l'athérosclérose**

Dans les conditions physiologiques normales, c'est à dire lorsque les cellules endothéliales sont au repos, elles expriment de façon prédominante des propriétés antithrombogéniques en maintenant notamment le rapport prostaglandines/thromboxane de telle sorte que l'endothélium ne soit pas proagrégant (à la différence de la subendothéliale qui est thrombogène) (Demuth et al, 1995). Dans l'espèce humaine, le précurseur le plus important des prostaglandines est l'acide arachidonique, un acide gras polyinsaturé en C20 à 4 doubles liaisons non conjuguées (Voet et Voet, 1998). L'acide arachidonique est formé par l'hydrolyse des phospholipides. Cette hydrolyse est réalisée soit par les phospholipases A2 (PLA2), soit par l'action combinée des phospholipases C (PLC) et de la diacyl glycérol lipase (Fig.I.4) (Murakami et al., 1997).

Les PLA2 modifient aussi les LDL in vitro en dégradant leurs phospholipides, ce qui produit des lysophospholipides et de l'acide arachidonique (Eckey et al, 1997). La sPLA2 (secretory PLA2) pourrait jouer un rôle dans les stades précoces de l'athérosclérose et on la trouve effectivement dans la paroi des artères athérosclérotiques, où elle contribuerait à la modification des LDL et la formation de cellules spumeuses (Elinder et al, 1997), (Menshikowski et al., 1995).

L'acide arachidonique est un précurseur des leucotriènes, des thromboxanes, des prostaglandines et des prostacyclines. Cette réaction est catalysée par la prostaglandine H<sub>2</sub> synthase (PGH<sub>2</sub> synthase) contenant une activité cyclooxygénase (COX) catalysant l'addition de 2 molécules d'O<sub>2</sub> sur l'acide arachidonique et une activité endoperoxydase transformant la fonction hydroperoxy en groupe OH, formant ainsi la PGH<sub>2</sub> (Fig.I.5). La PGH<sub>2</sub> est le précurseur immédiat de toutes les prostaglandines, des prostacyclines et des thromboxanes (Voet, Biochimie, 1998). Les plaquettes contiennent de la thromboxane synthase, qui assure la formation de thromboxane A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) à



partir de la PGH<sub>2</sub>. Le TxA<sub>2</sub> est un vasoconstricteur et un stimulateur d'agrégation des plaquettes (Demuth et al, 1995).

Les cellules endothéliales contiennent de la prostacycline synthase, qui catalyse la synthèse de prostacycline I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), un vasodilatateur et un inhibiteur de l'agrégation des plaquettes. La PGI<sub>2</sub> joue un rôle important en pathologie cardiovasculaire puisqu'il existe un lien entre sa biosynthèse par la paroi des vaisseaux et la vulnérabilité à la thrombose et à l'athérosclérose (Demuth et al, 1995). La capacité du tissu vasculaire à synthétiser la PGI<sub>2</sub> est diminuée en cas d'athérosclérose et ce phénomène serait lié à un dysfonctionnement des cellules endothéliales (Demuth et al, 1995). La production cellulaire de PGI<sub>2</sub> est finement régulée puisqu'elle nécessite l'activation séquentielle d'une PLA<sub>2</sub> calcium dépendante (libérant l'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires), d'une cyclooxygénase et d'une prostacycline synthase. Dans les cellules endothéliales, sa production est augmentée par les forces de cisaillement, différents facteurs de croissance et cytokines, l'endothéline-1, les polymorphonucléaires activés ainsi que les LDL oxydées (à court terme) car celles-ci fournissent le substrat (l'acide arachidonique) induisant la synthèse de PGI<sub>2</sub> (Demuth et al, 1995). En revanche, lors de périodes d'incubation prolongées (supérieures à 3 jours), on observe une diminution du relargage de PGI<sub>2</sub> par les cellules endothéliales sous l'influence des LDL oxydées. Les LDL oxydées seraient, par conséquent, en partie responsables de la diminution de la synthèse de PGI<sub>2</sub> observée dans les lésions athéromateuses, puisque dans le contexte de l'athérosclérose, les cellules endothéliales sont exposées de façon chronique aux LDL oxydées.

En cas d'activation de l'endothélium vasculaire (en particulier par les cytokines inflammatoires ou par des concentrations athérogènes de lipoprotéines), il existe donc une modulation de la synthèse des différents médiateurs par les cellules endothéliales qui entraîne le passage d'un phénotype anti- à un phénotype prothrombique. Il apparaît alors des anomalies dans le tonus vasculaire, ainsi qu'une prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires. Les LDL oxydées agiraient à un niveau transcriptionnel par l'intermédiaire de l'activation d'une protéine kinase C (PKC) aboutissant à l'activation d'un facteur de transcription, le facteur NFκB. Suite à cela, une multitude de gènes sont exprimés. Parmi ces molécules, celles dont la synthèse varie le plus en fonction de l'état d'activation des cellules endothéliales sont la PGI<sub>2</sub>, l'endothéline-1 (Et-1) et le facteur de relaxation dérivé de l'endothélium (EDRF).

La famille des endothélines comprend 3 peptides de 21 acides aminés, Et-1, Et-2 et Et-3, encodés par 3 gènes différents. Des trois formes d'endothélines connues, seule l'Et-1 est produite par les cellules endothéliales. Elle constitue un facteur régulateur local, agissant à plusieurs titres sur le système cardiovasculaire (Demuth et al, 1995) :



- c'est un peptide vasoconstricteur agissant directement sur les cellules musculaires lisses vasculaires, d'une part.
- c'est un agent mitogène des cellules musculaires lisses vasculaires et des cellules endothéliales, d'autre part.

La production d'Et-1 par les cellules endothéliales est modulée par les forces hémodynamiques et par différents facteurs humoraux. Sa production est diminuée par le NO (acide nitrique), la PGI<sub>2</sub> et les forces de cisaillement d'ordre physiologique. Par contre, sa production est augmentée lorsque les niveaux de cisaillement sont plus faibles, par la thrombine, l'insuline, le PDGF (platelet derived growth factor) et par les LDL oxydées. Les LDL oxydées induisent une synthèse de novo d'Et-1 et leur action passe, en partie, par leur liaison aux récepteurs scavenger. Par contre, les LDL natives n'ont pas d'action sur la synthèse d'Et-1 par les cellules endothéliales *in vitro*.

Le facteur de relaxation dérivé de l'endothélium, assimilé au NO, agit sur le tonus vasculaire :

- il exerce un effet vasodilatateur
- il inhibe la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires
- il diminue la production d'Et-1 par les cellules endothéliales

Ces différentes propriétés, associées à son pouvoir antiagrégant plaquettaire, semblent en faire un facteur anti-athérogène mais les effets du NO restent controversés et on parle du paradoxe du NO. Selon certains auteurs, ce composé posséderait des propriétés pro-oxydantes, selon d'autres, il inhiberait l'oxydation des LDL par les cellules. Cela étant dit, un relargage basal et continu de NO par les cellules endothéliales maintient les vaisseaux dans un état dilaté et il est clairement admis qu'il existe une diminution de la production de NO liée à un dysfonctionnement endothélial associé à l'athérosclérose. Les cellules endothéliales expriment une isoforme constitutive de NO synthase (NOS<sub>c</sub>), stimulée par l'augmentation de calcium intracellulaire et dont l'action est immédiate, par opposition à la NO synthase inductible (NOS<sub>i</sub>) des cellules musculaires lisses et des macrophages qui est indépendante du calcium intracellulaire et dont l'action ne se manifeste qu'après un délai de plusieurs heures. La production de NO par les cellules endothéliales est augmentée par les agonistes de la NOS<sub>c</sub> (acétylcholine, ADP, ATP, thrombine) et par les forces de cisaillement. Il semblerait aussi que l'IL-1, bien que diminuant l'expression de la NOS<sub>c</sub>, augmente globalement la production de NO par les cellules endothéliales en induisant la NOS<sub>i</sub> de ces cellules (Demuth et al, 1995).

L'IL-1 oriente les cellules endothéliales dans un sens prothrombique et pro-inflammatoire. Elle augmente l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1, *in vitro* et *in vivo*, ainsi que la production de divers facteurs de croissance et de cytokines par les cellules endothéliales : IL-8, facteurs de croissance hématopoïétique ou CSF, la molécule MCP-1 (monocyte



chemoattractant protein), ce qui conduit au recrutement des leucocytes. Elle augmente aussi la production de PDGF par les cellules endothéliales, entraînant la prolifération des cellules musculaires lisses sous-jacentes.

L'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales est une étape importante de la réponse inflammatoire puisqu'elle fait partie du processus de recrutement des leucocytes au niveau des lésions. Les cellules endothéliales ont un rôle majeur à ce niveau puisqu'elles définissent le type de leucocyte recruté en exprimant sélectivement différentes molécules spécifiques d'une classe de leucocytes. Ces molécules d'adhésion n'interviennent pas seulement dans la liaison des leucocytes, mais participent également à leur migration transendothéliale ainsi qu'à leur activation.

Les molécules d'adhésion exprimées par les cellules endothéliales appartiennent essentiellement à 2 familles : les sélectines et la superfamille des immunoglobulines (molécule Ig-like). Elles sont souvent inductibles.

Les sélectines sont exprimées après activation des cellules et lient les leucocytes par l'intermédiaire de leurs déterminants oligosaccharidiques de type sialyl Lewis x. Cette liaison active les leucocytes et augmente l'affinité de leur  $\beta 2$  intégrines pour les molécules d'adhésion de type Ig-like des cellules endothéliales qui sont les molécules ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) et ICAM-2 (intercellular adhesion molecule-2). La molécule ICAM-2 est exprimée constitutivement par les cellules, alors que la molécule ICAM-1 n'est exprimée que par les cellules endothéliales activées et de façon retardée par rapport aux sélectines.

Il existe un autre processus spécifique médiant l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales, faisant intervenir les  $\beta 1$  intégrines des monocytes et la molécule VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) des cellules endothéliales. Le mécanisme de l'induction de ces molécules d'adhésion par les cellules endothéliales ferait intervenir le facteur de transcription NF $\kappa$ B.

Parmi les molécules d'adhésion des cellules endothéliales, VCAM-1 et ICAM-1 sont les plus impliquées dans la liaison des leucocytes aux cellules endothéliales et sont celles dont l'expression est augmentée dans les lésions athéromateuses et chez les patients hypercholestérolémiques. Elles constituent donc 2 marqueurs reconnus d'activation des cellules endothéliales dans le cadre de l'étude de l'athérosclérose (Demuth et al, 1995) : leur expression à la surface des cellules endothéliales n'est pas constitutive, mais leur synthèse et leur expression sont induites par différentes cytokines (IL-1, TNF  $\alpha$ ), par les GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) et les LDL oxydées.

Enfin, une autre molécule d'adhésion est présente au niveau des lésions. Il s'agit de la VE-Cadhérine (vascular endothelial cadhérine), impliquée dans des liaisons homotypiques au sein des cellules endothéliales (une VE-Cadhérine liant une autre VE-Cadhérine). Cette molécule est très peu exprimée au niveau des artères normales (on la retrouve dans l'adventice et un peu dans la média)



tandis qu'on la retrouve dans toutes les couches de l'artère, y compris dans l'intima, au niveau des lésions précoces de l'athérosclérose (Bobryshev et al, 1999).

D'autres molécules interviennent dans le recrutement et l'activation des monocytes. Il s'agit de l'IL-8, des CSF et de la protéine MCP-1.

Les CSF et les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF) activent globalement les cellules endothéliales et induisent leur prolifération et leur migration *in vitro* et possèdent des propriétés angiogènes *in vivo*.

Le MCP-1 constitue également un marqueur d'activation de ces cellules dans le contexte de l'athérosclérose ; il peut être produit par toutes les cellules de la paroi artérielle lorsqu'elles sont activées et possède une action chimiotactique absolument spécifique vis-à-vis des monocytes, qu'il peut donc attirer et activer. Cette protéine agit non seulement comme facteur chimioattractif mais augmente aussi la force des liaisons entre monocytes et cellules endothéliales. Cette cytokine n'est pas produite par les cellules endothéliales au repos, mais seulement lorsqu'elles sont activées.

Les cellules endothéliales constituent la source majeure de MCP-1, et ceci particulièrement dans les lésions précoces de la plaque d'athérome.

Après stimulation à l'IL-1, les cellules produisent aussi du PDGF. Ce facteur de croissance est puissamment athérogène puisqu'il induit à la fois la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses depuis la média vers l'intima, ainsi qu'une augmentation de la liaison et de la capture des LDL par ces cellules, aboutissant à leur hyperplasie.

Il est fort probable qu'aucun de ces facteurs n'agisse seul dans les processus d'athérogenèse. Il y a des interactions entre ces différents facteurs, chaque facteur pouvant mener à l'expression d'autres facteurs (Ross, 1993).

En résumé, ces différents gènes peuvent être regroupés globalement en catégories fonctionnelles :

- gènes impliqués dans la croissance : FGF, PDGF, CSF-1,...
- gènes impliqués dans la réponse inflammatoire : IL-8, MCP-1, sPLA2, cPLA2, COX,...
- gènes impliqués dans l'adhésion : ICAM-1, VCAM-1, Intégrines, VE-Cadhérine,...
- gènes impliqués dans le tonus vasculaire : NOSi, NOSc, Endothéline-1,...

Afin de comprendre ce qui se passe précocément au niveau des lésions athérosclérotiques, nous allons étudier un modèle d'activation de cellules endothéliales murines en culture, activées par des lipoprotéines athérogènes, les  $\beta$ -VLDL (voir chapitre 4 de l'introduction). Afin de comprendre ce qui se passe dans ce modèle, nous allons utiliser au laboratoire deux approches au niveau moléculaire :



- l'analyse au niveau de la synthèse protéique, utilisant la technique des gels à deux dimensions. Ce travail est réalisé par A.-C. Huet et M. Martin
- l'analyse au niveau transcriptionnel en utilisant la technique des biochips. Nous utiliserons cette approche dans le cadre de ce mémoire.

Mais avant d'aborder la technique des biochips proprement dite, nous allons brièvement passer en revue les différentes approches méthodologiques permettant de comparer l'expression génique dans des cellules contrôles et dans des cellules stimulées ou malades.

## 2. Techniques classiques utilisées dans l'étude de l'expression génique

Quand on veut comparer l'expression de deux populations cellulaires, on peut l'envisager soit à l'échelle des protéines, soit à l'échelle des ARNm. Quand on s'intéresse aux protéines, l'approche la plus performante à l'heure actuelle, est celle des gels d'électrophorèse bidimensionnels, qui sont à la base de l'approche protéomique. Au laboratoire, A.-C. Huet et M. Martin ont entrepris de comparer des cellules endothéliales murines stimulées ou non avec des lipoprotéines athérogènes, les  $\beta$ -VLDL.

Dans ce mémoire, nous nous focalisons sur l'expression à l'échelle des ARNm, mais il est clair que les deux approches sont complémentaires, d'autant plus que transcription n'implique pas nécessairement traduction.

Plusieurs techniques offrent la possibilité de comparer le profil d'expression génique au niveau ARN entre un échantillon test et un échantillon contrôle. Il est intéressant d'aborder ces techniques afin de comprendre pourquoi notre choix s'est basé sur les biochips.

Le Northern blot est un procédé qui utilise la propriété de la nitrocellulose de fixer de manière très stable l'ARN. Après une électrophorèse, destinée à séparer les différents ARN, le gel est recouvert d'une membrane de nitrocellulose. Celle-ci est recouverte à son tour par plusieurs couches de serviettes en papier. L'ARN est alors transféré par capillarité, sur la membrane, formant une empreinte point par point sur la membrane. La feuille de nitrocellulose est alors séchée sous vide à 80 °C, ce qui assure l'immobilisation de l'ARN sur la nitrocellulose. L'ARN d'intérêt est ensuite détecté par une sonde d'ARN ou d'ADN spécifique radio-marquée dans une étape d'hybridation. Cette technique de détection autorise l'étude d'un seul transcrit à la fois puisque une seule sonde marquée est utilisée. De plus, elle présente l'inconvénient d'utiliser la radioactivité, ce qui exige des précautions spéciales



lors des manipulations, à cause des risques pour la santé et des règles strictes concernant le stockage des déchets. En outre, elle nécessite une grande quantité d'ARN et elle n'est applicable qu'aux gènes hautement exprimés, ne détectant pas les gènes faiblement exprimés, qui représentent environ 90 % des transcrits (Hengen, 1995) (Fig.I.6).

La RT-PCR est une technique très sensible qui permet de mettre en évidence de très petites quantités d'un ARNm particulier. Elle consiste en la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire (ADNc) du brin d'ARNm à détecter. Ensuite, ce brin d'ADNc servira de matrice pour la synthèse du deuxième brin et ces deux brins seront amplifiés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR ou Polymerase Chain Reaction) (Peccoud, 1993). Pour pouvoir estimer la quantité d'ADN « template » que l'on a dans un échantillon avant PCR, il faut réaliser la PCR en même temps qu'une PCR sur un nombre connu de copies d'un autre ADN appelé ADN standard. Cette deuxième PCR peut se faire soit dans un deuxième tube, soit dans le même tube que la PCR d'intérêt. Dans le premier cas, on parlera de PCR quantitative par rapport à un standard externe alors que dans le deuxième cas, on a à faire à un standard interne (ou PCR compétitive). Ces PCR doivent utiliser exactement les mêmes conditions de cycles, de préférence les mêmes amorces, et amplifier des amplicons ayant des tailles et des rapport en GC proches, ce afin que l'efficacité de l'amplification pour ces deux séquences soit équivalente (Peccoud, 1993). L'avantage de cette technique est de mettre en évidence des gènes faiblement exprimés, non détectables par la technique du Northern Blot. De plus, l'analyse par RT-PCR est limitée comme le Northern blot à l'analyse d'un ARNm à la fois.

L'hybridation soustractive est une technique qui consiste à extraire l'ARNm d'une population prise comme référence. Une transcription inverse est ensuite réalisée sur l'ARNm de la population contrôle, et l'ADNc marqué provenant de cette dernière est ensuite hybridé avec les ARNm de la population test. On récupère ensuite les ARNm qui ne se sont pas hybridés, c'est à dire les ARNm qui n'étaient pas présents dans la population contrôle, puis, via la construction de banques d'ADNc, on recherche les gènes auxquels ils correspondent. L'avantage de cette méthode est d'être simple, rapide et de permettre la détection des gènes faiblement exprimés (Meszaros et al, 1996). Cette technique présente l'inconvénient de nécessiter une grande quantité d'ARN de départ et ne permet pas la comparaison de plus de deux populations (Meszaros et al, 1996).

Le differential display est une technique de comparaison de l'expression génique dans deux ou plusieurs populations. L'ARN total des cellules est extrait et rétrotranscrit à l'aide de 4 amorces poly-T terminées par A, T, C ou G. Ces amorces poly-T vont s'hybrider à la queue poly-A des ARN messagers et



permettre leur sélection à partir de l'ARN total. De plus, elles vont nous permettre de diviser la population totale d'ARNm en 4 sous-populations (suivant la base à la fin de l'amorce poly-T). Ensuite, on amplifie par PCR l'ADNc néosynthétisé en utilisant 2 amorces, les amorces poly-T ayant servi à la rétrotranscription et une série d'amorces « aléatoires » arbitrairement choisies. Cette PCR est réalisée avec des oligonucléotides marqués radioactivement. On génère ainsi une série d'amplicons qu'on sépare sur gel de polyacrylamide. On récupère ensuite les bandes d'intérêt à partir de ces gels, c'est à dire les bandes absentes ou présentes uniquement dans une des populations, ou celle dont l'intensité varie dans ces populations. Puis, on extrait l'ADNc qu'on peut alors réamplifier, cloner et séquencer. Ce séquençage ne suffit pas pour dire si l'expression augmente ou diminue. Il est alors nécessaire de confirmer les différences d'expression par Northern blot, car la méthode génère de nombreux faux positifs. Cette technique permet d'identifier de nouveaux gènes mais elle présente le désavantage d'être lente.

Dès lors, nous avons choisi d'appliquer la technique des biochips afin de comparer la différence d'expression génique entre des cellules stimulées et des cellules contrôles. En effet, cette technique a pour avantage d'être rapide, de ne pas utiliser de radioactivité pour la détection et de permettre l'analyse simultanée de nombreux transcrits au sein d'une cellule.

### 3. Les Biochips

#### 3.1 Fonction générale de la biochip

La clôture prochaine du séquençage de tous les gènes humains donne à la biologie un territoire immense et inexploré. Face à cette augmentation exponentielle des données, la bioinformatique se constitue en une nouvelle discipline, la génomique, dont l'objectif est de modéliser le fonctionnement du génome et son rôle dans la régulation cellulaire. Le « transcriptome » d'une cellule, c'est-à-dire l'ensemble de ses ARNm, occupe à cet égard une position clé puisqu'il est à la fois le produit de l'état transcriptionnel du génome et le précurseur du protéome, l'ensemble des protéines responsables du phénotype cellulaire. L'étude de la dynamique de la cellule et du génome impose donc de relever un défi technologique gigantesque : l'analyse simultanée d'un mélange complexe de plusieurs dizaines de milliers d'espèces d'ARNm, dont les niveaux d'expression varient de 1 à 10000 transcrits par cellule. Jusqu'à récemment, un tel instantané de l'état transcriptionnel d'une cellule était inaccessible par les techniques citées plus haut (Fig. I.6).

Aujourd'hui la biochip est l'outil idéal pour atteindre cet objectif. Elle permet le passage de l'étude individuelle des gènes (Northern blot) à une



analyse en parallèle de plusieurs milliers de gènes différents. En effet, la biochip, encore appelée microdamier d'ADN, est un support solide sur lequel on a greffé de très nombreuses séquences d'ADN de capture (ou trappeurs) de manière à détecter simultanément la présence de plusieurs acides nucléiques cibles présents dans un échantillon (Ramsay et al, 1998). Le support le plus couramment utilisé est le verre en raison de son autofluorescence faible, sa transparence, son faible coût et sa résistance aux températures élevées (Zammatteo et al, 1999). D'autres supports sont également employés tels que le silicium, la polyacrylamide, les filtres de nylon (Bellis, 1997).

Les biochips ont été conçues avec l'idée de miniaturiser le « reverse dot blot », qui analyse l'expression des ARN messagers via leur hybridation sur une banque d'ADNc greffée sur un filtre en nylon (Lander, 1999). Les avantages d'un support solide comme le verre par rapport aux filtres en nylon sont l'absence de diffusion et de pénétration des ADN cibles qui ont un meilleur accès aux ADN trappeurs fixés (Southern et al, 1999), la fiabilité de la miniaturisation ainsi que la facilité de détection en fluorescence (Lander, 1999).

La technique des biochips est idéale pour identifier et doser des fragments d'ADN ou d'ARN grâce à leur hybridation sur des oligonucléotides greffés à un support solide. Cette méthode révolutionnaire est pluridisciplinaire puisqu'elle peut faire appel à la micro-électronique pour l'élaboration d'un support conducteur composé de microélectrodes, à la chimie combinatoire pour la synthèse des sondes ADN sur ce support, à la biologie moléculaire pour la préparation des échantillons à analyser et leur hybridation et, enfin, à l'informatique pour la détection et le traitement des signaux émis.

L'efficacité de la biochips dépend principalement de la séquence et de la longueur des sondes de capture et de la façon dont elles sont attachées sur le support (Zammatteo et al, 1999).

Les biochips permettent, en quelques heures, l'analyse simultanée de l'expression de nombreux gènes, la détection de mutations, le diagnostic moléculaire,...

### **3.2 Etapes de construction d'une biochip**

La construction d'une biochip débute par la sélection des sondes à fixer sur le support solide. Dans la plupart des cas, ces sondes sont choisies directement à partir des banques de données telles que Genbank, dbEST et Unigene (Duggan et al, 1999).

Il existe un nombre impressionnant de biochips déjà décrites et chacune d'elles se différencie par la chimie de couplage des ADN de capture sur le support, par le mode d'adressage des ADN de capture sur le support, par le type de marquage des cibles ADN ainsi que par le système de détection utilisé.



### 3.2.1 Chimie de couplage des ADN de capture

Diverses méthodes de couplage non covalentes sont couramment utilisées pour fixer l'ADN sur du verre telles que des interactions électrostatiques par l'intermédiaire d'un dépôt de polylysine ou des interactions hydrophobes (Zammatteo et al, 1999). Cependant, dans ces conditions, l'ADN peut se détacher de la surface à force ionique ou température élevées, conditions requises pour mener à bien l'hybridation. De plus, l'ADN est souvent attaché sur toute sa longueur et est donc moins accessible pour l'hybridation.

Dès lors, l'immobilisation covalente de l'ADN par une de ses extrémités est préférée, car dans cette configuration la totalité de la séquence est accessible.

Selon ce principe, de l'ADN phosphorylé ou carboxylé peut être immobilisé sur un support aminé en présence de carbodiimide. De l'ADN aminé peut aussi être lié à du verre aminé par de l'isothiocyanate, par des aldéhydes ou par des groupements époxydes (Zammatteo et al, 1999). Dans ces cas, le lien est stable, même à température élevée.

Parmi ces méthodes, l'ADN aminé lié à du verre modifié avec des aldéhydes est certainement l'une des meilleures méthodes car la cinétique de réaction est rapide, le rendement de couplage est élevé et de plus cette méthode ne requiert aucun agent de couplage (qui pourrait être une source de variabilité supplémentaire).

### 3.2.2 Mode d'adressage de l'ADN capteur

Plusieurs approches peuvent être utilisées pour préparer la biochip. D'une part, l'ADN peut être synthétisé *in situ* grâce à la chimie combinatoire sur la surface du verre, procédé utilisé par la firme Affymetrix. D'autre part, la chip peut être préparée par des micro-dépôts d'ADNc amplifiés par Polymerase Chain Reaction (PCR). Ce micro dépôt se fait à l'aide d'un robot ou arrayer.

#### - La synthèse *in situ*

Le procédé Affymetrix repose sur la synthèse *in situ* d'oligonucléotides avec des méthodes sophistiquées empruntées au procédé de gravure des puces informatiques par photolithographie (Bellis et Casellas, 1997).

La synthèse *in situ* permet la construction d'ADN de capture par couplage en couches successives de nucléotides sur le support en verre. Lors de la première étape de construction des sondes, une surface de verre activée, portant des groupes photolabiles, est en partie couverte par un masque de forme définie. Cette forme laisse accessible à la lumière certains sites. L'illumination conduit à la déprotection des groupes exposés qui sont alors activés pour le couplage du premier nucléotide. Le nucléotide ajouté est porteur d'un groupe photolabile



permettant ainsi de continuer la synthèse. L'utilisation de masques de formes différentes permet la construction d'oligonucléotides de taille et de séquence souhaitées en des sites parfaitement définis (Fig.I.7). L'enchaînement de plusieurs étapes de protection et de synthèse chimique aboutit à un accroissement exponentiel du nombre d'oligonucléotides à la surface du support, et ce, pour un nombre d'étapes relativement faibles. Par cette méthode, les trappeurs peuvent avoir une taille comprise entre 10 et 25 bases (Zammatteo et al, 1999).

### - Le microspotting mécanique

Cette technique, utilisée notamment par la société américaine Synténi, nécessite la synthèse, la purification et le stockage des ADN capteurs avant de passer à l'étape de couplage. Les microdépôts des capteurs sont opérés par un robot. Ce système a été conçu pour l'exploitation de banques d'ADNc, dont les clones sont stockés dans des plaques multi-puits (Bellis et Casellas, 1997). Un robot commande le déplacement d'une tête d'impression à plusieurs aiguilles qui dépose l'ADNc sur le support solide. L'avantage majeur de cette technique par rapport à la synthèse *in situ* est une plus grande flexibilité dans le choix de la taille des capteurs pouvant aller de 20 bases à 2 Kb. En effet, l'utilisation de grands capteurs permet d'augmenter le rendement d'hybridation sur support solide (Zammatteo et al, 1997).

Le microspotting mécanique utilise un procédé passif (aiguilles) ou actif (propulsion des oligonucléotides par système piezoélectrique) pour distribuer de petites quantités d'ADN sur le substrat, selon un pattern défini et connu.

### 3.3 Utilisation de la biochip

Le moteur de la réaction est un appariement de bases nucléotidiques entre les ADN cibles et de capture de la biochip. Le principe de la biochip appliqué à la mesure de l'expression différentielle des gènes dans deux populations cellulaires, l'une contrôle et l'autre test, est présenté à la Fig . I.8. Les ARNm sont extraits puis reverse transcrits en ADNc marqués puis hybridés sur la chip composée d'un damier de sondes de capture à des sites bien définis. Les hybrides peuvent alors être détectés et les signaux obtenus quantifiés. On obtient finalement une véritable carte d'identité du profil d'expression de la cellule en conditions de contrôle et de test. .

La réaction individuelle entre une cible C et une sonde de capture S pour donner un hybride H est représentée de manière simplifiée par l'équation réactionnelle :  $C + S \leftrightarrow H$ . Le principe de la biochip est de mettre en présence un grand nombre de sondes et de cibles ce qui rend difficile la modélisation du système. du fait de différents niveaux de rendement des réactions individuelles.



Ainsi, les paramètres qui gouvernent aussi bien la vitesse d'hybridation que la stabilité des hybrides varient avec les caractéristiques propres à chacune des sondes (taille, séquence...). Cette première difficulté est contournée grâce à l'ajout dans le mélange à analyser d'agent chaotropes qui minimisent ces variations indésirables (Maskos et al., 1993, *Nucleic acids res.* 22, 1368-73). La présence d'homologie de séquence entre certaines cibles pose aussi un problème. Elle se traduit par une compétition pour les mêmes sondes et, pour assurer la spécificité du signal, il faut rendre cette compétition favorable aux cibles parfaitement complémentaires. Les courtes sondes sont très discriminantes car l'existence de plusieurs mésappariements provoque une diminution importante de la constante d'équilibre (Gotoh, 1995, *DNA res.* 2, 285-93) et assure une bonne spécificité de l'hybridation. Cependant lorsque les cibles visées sont peu homologues, de longues sondes sont préférables car elles permettent d'atteindre de plus haut rendements d'hybridation (Zammatteo et al. 1997, *Anal Biochem*), ce qui est utile pour mettre en évidence les gènes faiblement exprimés.

La quantification de la concentration des cibles détectées sur chip est un objectif fréquemment recherché. Dans la pratique, l'incorporation de témoins internes et de divers contrôles montre que le dosage est effectif sur trois ordres de grandeur (Lockhart, 1996, *Nature Biotech*, 14, 1675-80).

### 3.4 Détection des biochips

Afin d'avoir une détection de qualité, il faut tenir compte de plusieurs paramètres tels que la résolution spatiale, la sensibilité, la miniaturisation et le type de molécules qui marquent les molécules cibles. La méthode de détection la plus courante est la fluorescence mise en évidence par un scanner confocal ou une caméra CCD (Bellis et Casellas, 1997). Lors de la synthèse des ADN cibles, il faut les marquer avec des fluorochromes, molécules fluorescentes. Les fluorochromes les plus souvent employés sont la cyanine-3 qui émet dans le jaune et la cyanine-5 qui émet dans le rouge. La détection des biochips se fait alors via un scanner confocal. Le laser du scanner envoie un faisceau lumineux sur le fluorochrome, ce qui l'excite. Celui-ci renvoie alors de la lumière à une longueur d'onde plus élevée que celle de départ. Suivant l'intensité de la lumière émise, on peut estimer l'abondance relative des cibles hybridées (Duggan et al, 1999).



### 3.5 Applications

#### 3.5.1 Identification de mutations

Grâce aux biochips, il est possible de discriminer des séquences nucléotidiques proches, ce qui permet l'identification de mutations et de polymorphismes génétiques. Il existe une chip permettant de détecter toutes les mutations possibles de la séquence de 3,45 kb du gène BRCA1 par exemple. Des mutations dans ce gène sont impliquées dans les cancers du sein et des ovaires (Ramsay, 1998). Les biochips peuvent être ainsi utilisées pour la détection de mutations dans le gène de la transcriptase inverse et de la protéase du virus HIV-1. De telles mutations peuvent causer la résistance aux inhibiteurs de reverse transcriptase, comme l'AZT (Lipshutz et al, 1997).

#### 3.5.2 Diagnostic de maladies

Afin de comprendre le cancer humain au niveau moléculaire, l'Institut National du Cancer a lancé un projet de recherche qui vise à la production et au séquençage de banques d'ADNc provenant de 5 cancers humains importants, à savoir, les cancers de la prostate, des ovaires, des poumons, du cerveau et des intestins (Cole et al, 1999).

La chip ADN est amenée à jouer un rôle d'interface privilégié au cours du diagnostic, du pronostic et du suivi thérapeutique. Une adaptation optimale du traitement découlera, par exemple, d'une classification plus élaborée des tumeurs en oncologie, ou de la recherche de variants particuliers dans une population virale (HIV), et dans tous les cas d'une connaissance de la constitution génétique du patient (Bellis et Casellas, 1997).

#### 3.5.3 Développements pharmaceutiques

Dans l'industrie pharmaceutique, la puce trouvera une place de choix aussi bien au niveau de la recherche, de la toxicologie (Henry, 1999) qu'au niveau du développement de médicaments. La connaissance du spectre d'action d'un médicament sur les cibles cellulaires et les modèles animaux nous informera sur les mécanismes d'action moléculaires et donc, permettront de définir correctement le potentiel thérapeutique réel des molécules. Elles permettront, par exemple, d'identifier rapidement les effets secondaires éventuels, qui parfois ne sont visibles qu'au cours des phases tardives du développement du produit (Bellis et Casellas, 1997).

Les chips peuvent être utilisées pour mesurer le taux d'ARN messager, permettant ainsi de comparer la différence d'expression génétique entre tissu



sain et tissu malade, ce qui permettra l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques (Debouck et al, 1999).

### **3.6 Intérêt de la biochips dans le cadre de ce mémoire**

Nous allons donc développer une biochip sur un support en verre. La chimie de couplage employée permet la liaison covalente du trappeur aminé, par adressage mécanique, sur la lame de verre fonctionnalisée avec des aldéhydes. Les modes de détection testés seront la fluorescence et une nouvelle technique colorimétrique faisant appel à la précipitation d'une solution d'argent.

L'intérêt à long terme du développement de cette biochip dans le cadre de ce mémoire est de pouvoir comparer l'expression génique de cellules saines avec l'expression génique de cellules provenant de lésions athérosclérotiques, afin de comprendre ce qui se passe précocement au niveau des lésions.

Cette biochip devrait permettre une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires à la base de l'épaississement de la paroi vasculaire. Elle devrait donc également permettre de mieux évaluer l'effet de diètes et des traitement médicamenteux sur l'apparition et l'évolution des lésions dans les parois artérielles.

## **4. Contexte du travail**

Le projet s'intègre dans un programme de recherche en réseau (PAI) avec 3 universités : l'UCL, la KUL et les FUNDP. Notre contribution consiste entre autre à travailler sur des cellules endothéliales en culture. Il s'agit de cellules endothéliales murines, immortalisées (voir Matériel et méthodes) qui nous ont été fournies par le CMVB de la KUL. Au laboratoire, A.-C. Huet et M. Martin ont montré que lorsque l'on incube ces cellules endothéliales en présence de  $\beta$ -VLDL, lipoprotéines majeures chez la souris, elles s'activent :

- primo, elles deviennent plus « collantes » pour les monocytes, ce qui se traduit par une adhérence accrue de monocytes mis à incuber avec les cellules endothéliales (Fig.I.9). in vivo, l'adhérence des monocytes sur les cellules endothéliales favorise la diapédèse et est donc considérée comme un événement précoce dans la mise en place des lésions ;
- secundo, étant donné que plusieurs protéines d'adhérence sont sous le contrôle du facteur transcriptionnel NF $\kappa$ B (Fig.I.10), l'activation de ce facteur a été étudiée dans les cellules endothéliales incubées en présence de  $\beta$ -VLDL. A.-C. Huet ET M.Martin ont vérifié l'activation du facteur NF $\kappa$ B par 3 approches différentes :
  - 1. Le retard sur gel (ou EMSA pour electrophoretic mobility assay), qui permet d'estimer la capacité du facteur transcriptionnel NF $\kappa$ B de se lier à



- une sonde oligonucléotidique double brin radioactive spécifique ;
- 2 ; un test colorimétrique développé au laboratoire par P. Renard ;
3. l'utilisation d'un gène reporteur, la luciférase, sous le contrôle d'un promoteur artificiel contenant 4 fois le motif consensus reconnu par le facteur NF $\kappa$ B. Si le facteur NF $\kappa$ B est activé, il y aura donc transcription et traduction du gène codant pour la luciférase et l'activité luciférase, facile à doser, dépendra donc du degré d'activation du facteur NF $\kappa$ B.

Les protéines d'adhérence impliquées ne sont pas encore complètement identifiées et les mécanismes moléculaires conduisant à l'activation du facteur NF $\kappa$ B dans les cellules endothéliales incubées en présence de  $\beta$ -VLDL restent méconnus ; mais ces travaux démontrent bien que les  $\beta$ -VLDL activent les cellules endothéliales et qu'elles sont capables d'agir au niveau transcriptionnel. C'est dans ce cadre que s'inscrit ce mémoire. Il s'agit en effet de déterminer l'effet des  $\beta$ -VLDL sur l'expression des gènes potentiellement impliqués dans l'athérosclérose sélectionnés sur la chip, le but final étant de comparer l'expression génique de cellules saines avec celle de cellules provenant de lésions athérosclérotiques.

# **Matériels**

## **et**

# **Méthodes**



## 1. Culture cellulaire

Dans le cadre de ce travail, nous avons travaillé sur des cultures de cellules endothéliales b-END 5 provenant de cerveau de souris. Il s'agit d'une lignée continue résultant de la transformation des cellules par l'antigène Middle T du virus polyoma.

### 1.1 Matériel

- DMEM (**Gibco Brl**, Paisley, Grande – Bretagne)
- DMEM + 10 % sérum : milieu DMEM additionné de 10 % de sérum de veau fœtal (**Gibco Brl**, Paisley, Grande – Bretagne)
- Milieu de rinçage : PBS
  - Trypsine EDTA (0,25 % de trypsine) (**Gibco Brl**, Paisley, Grande – Bretagne)
- Boîtes de culture stériles de 25 cm<sup>2</sup> (T25) ou 75 cm<sup>2</sup> (T75) (**Costar**, Cambridge, USA)

### 1.2 Méthode

Les cellules sont maintenues en culture selon la méthode classique décrite par Hayflick (Hayflick , 1965).

Elles sont cultivées dans des boîtes de culture de 75 cm<sup>2</sup> (T75). Quand elles sont à confluence, elles sont repiquées dans des conditions stériles.

La première étape de ce repiquage consiste à rincer les cellules à l'aide d'un de milieu de rinçage pour retirer le sérum contenant des protéases qui inhibent l'action de la trypsine.

Ensuite, 2 ml de trypsine sont versés par T75 et les cellules sont incubées à 37 °C (température optimale d'action de la trypsine) durant environ 3 minutes. En fin d'incubation, le détachement des cellules est contrôlé au microscope et 8 ml de milieu DMEM + 10 % sérum sont ajoutés par T75.

A ce stade, les agrégats cellulaires sont rompus à l'aide d'une pipette pasteur et le tout est transféré dans un tube de 10 ml. Il s'en suit une centrifugation à 1000 rpm durant 10 minutes.

Le culot est resuspendu dans 8 ml de milieu DMEM + 10 % sérum. Le milieu contenant les cellules est homogénéisé à l'aide d'une pipette pasteur.

1 ml de ce milieu contenant les cellules sera ajouté à 14 ml de milieu DMEM + 10 % sérum pour chaque nouvelle T75.

Enfin, les boîtes de culture sont entrouvertes et placées dans une étuve diffusant de l'air chargé de 5 % de CO<sub>2</sub>, afin d'ajuster le pH du milieu de culture.

## 2. Stimulation des cellules b-END5 à l'Interleukine-1

### 2.1 Matériel

- DMEM (**Gibco Brl**, Paisley, Grande – Bretagne)
- Milieu de rinçage : DMEM
- Interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 10 ng/ml (**Immunosource**, Zoersel-Halle, Belgique)
- Boîtes de culture stériles de 75 cm<sup>2</sup> (T75) (**Costar**, Cambridge, USA)

### 2.2 Méthode

La stimulation se produit lorsque les cellules sont subconfluentes. Le milieu est alors décanté et 10 ml de DMEM sont ajoutés afin de rincer les cellules.

Les cellules sont ensuite stimulées par ajout de 500  $\mu$ l d'IL-1 $\beta$  à 4,5 ml de DMEM pour une T75.

Enfin, les cellules sont incubées à 37 °C dans une étuve diffusant de l'air chargé de 5 % de CO<sub>2</sub> durant 6 heures.

Par la suite, nous pourrions extraire l'ARN de ces cellules.

## 3. Extraction d'ARN total des cellules en culture

Cette étape est rendue très délicate de part la présence de RNAses, tant endogènes qu'exogènes. Dès lors, pour empêcher leur action, différentes précautions doivent être prises.

Tout d'abord, la plupart des opérations se déroulent à 4 °C afin de bloquer toute action des nucléases. Ensuite, le tampon de lyse contient du thiocyanate de guanidine et du  $\beta$ -mercaptoéthanol, qui sont des inhibiteurs de RNAses.

Enfin, toute contamination éventuelle par des RNAses exogènes sera prévenue par l'utilisation exclusive de matériel libre de toute RNase, et l'expérimentateur se munira de gants de latex.



### 3.1 Matériel

- Kit RNAgents Total RNA Isolation System (**Promega**, Madison, USA) composé de :
  - SV RNA lysis buffer : - Thiocyanate de guanidine 4M
    - Tris pH 7,5 0,01M
    - $\beta$ -mercaptoéthanol 0,97 %
  - SV RNA wash solution : - Acétate de potassium 162,8 mM
    - Tris-HCl pH 7,5 27,1 mM
    - Ethanol 60%
- Ethanol absolu (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
- Milieu de rinçage : PBS
- Centrifugeuse (**Beckman JA-21**)

### 3.2 Méthode

La boîte de culture contenant les cellules est rincée deux fois avec 10 ml de milieu de rinçage dont une fois avec du milieu de rinçage froid (4 °C). Cette étape consiste à éliminer les cellules mortes qui flottent.

450  $\mu$ l de tampon de lyse sont ajoutés à chaque boîte (le tout est fait sur glace). Le contenu de la boîte est ensuite transféré dans un ou plusieurs eppendorf(s).

350  $\mu$ l de SV RNA dilution sont ensuite ajoutés aux 175  $\mu$ l de lysat. Les eppendorfs sont alors inversés 3 à 4 fois et placés à 70 °C durant 3 minutes.

Il s'ensuit une centrifugation à 12000 rpm durant 10 minutes. Le culot protéique est éliminé et la solution de lysat est transférée dans un nouvel eppendorf.

Par eppendorf sont ajoutés 200  $\mu$ l d'éthanol 95 % et le tout est transféré sur une colonne de silice. Il s'ensuit une centrifugation à 12000 rpm durant 1 minute. Le liquide est alors éliminé et 600  $\mu$ l de SV RNA wash sont ajoutés. Le tout étant à nouveau centrifugé à 12000 rpm durant 1 minute.

Le tube collecteur est vidé et on dépose sur chaque colonne un mélange constitué de :

- 40  $\mu$ l Yellow core
- 5  $\mu$ l  $MnCl_2$  0,09M
- 5  $\mu$ l DNase I (sur glace)

Le tout est incubé 15 minutes à température ambiante.

200  $\mu$ l de DNase stop solution sont ajoutés et il s'ensuit une centrifugation à 12000 rpm durant 1 minute. 600  $\mu$ l de SV RNA wash solution

sont alors ajoutés et une centrifugation est effectuée à 12000 rpm durant 1 minute. Le tube collecteur est ensuite vidé.

250 µl de SV RNA wash sont ajoutés puis nous réalisons à nouveau une centrifugation à 12000 rpm pendant 2 minutes.

La colonne est ensuite transférée dans le tube d'élution RNase free et 100 µl d'eau RNase free sont alors ajoutés. Une centrifugation à 12000 rpm durant 1 minute permettra de récupérer l'éluat contenant l'ARN total. Celui-ci sera aliquoté et conservé à -70 °C.

## 4. Purification d'ARN messenger à partir d'ARN total

### 4.1 Principe

L'ARN messenger est purifié avec le kit Oligotex mRNA for isolation of mRNA from total RNA (**Qiagen**, Hilden, Allemagne). La colonne de purification comporte des oligo-dT permettant de retenir spécifiquement les queues poly-A de l'ARN messenger, en présence d'une forte concentration en sels. Ainsi, l'ARN messenger est séparé des ARN ribosomiaux et de transfert.

### 4.2 Matériel

- Suspension Oligotex constituée de :
  - 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
  - 500 mM NaCl
  - 1 mM EDTA
  - 0,1 % SDS
  - 0,1 % NaN<sub>3</sub>
- Tampon de lavage OW2 constitué de :
  - 10 mM tris-HCl, pH 7,5
  - 150 mM NaCl
  - 1 mM EDTA
- Tampon d'élution OEB constitué de :
  - 5 mM Tris-HCl, pH 7,5
- Tampon OBB constitué de :
  - 20 mM Tris-HCl, pH 7,5
  - 1 M NaCl
  - 2 mM EDTA
  - 0,2 % SDS
- H<sub>2</sub>O RNase free
- Centrifugeuse (**Beckman JA-21**)



### 4.3 Méthode

Il faut tout d'abord faire attention à ne pas utiliser plus de 1 mg d'ARN total par colonne.

La quantité d'ARN total désiré est pipetée et placée dans un eppendorf. De l'eau RNase free sera ajoutée afin d'ajuster le volume à 250 µl.

250 µl de tampon OBB et 15 µl de suspension Oligotex sont ajoutés. Le tout est alors incubé pendant 3 minutes à 70 °C puis 10 minutes à température ambiante. Il s'ensuit une centrifugation à 13000 rpm durant 2 minutes.

Le culot est resuspendu dans 400 µl de tampon OW2. Ce mélange est ensuite déposé sur une spin colonne et centrifugé pendant 1 minute à 13000 rpm.

La spin colonne est transférée sur un nouvel eppendorf et 400 µl de tampon OW2 sont déposés sur la colonne. Il s'ensuit à nouveau une centrifugation à 13000 rpm durant 1 minute.

La spin colonne est transférée sur un nouvel eppendorf et 30 µl de tampon d'élution OEB chaud (70 °C) sont ajoutés. On pipette plusieurs fois afin de resuspendre la colonne et on centrifuge à 13000 rpm pendant 1 minute. Cette étape est réalisée deux fois.

Le surnageant contenant l'ARN messager est récupéré et stocké à -70 °C.

## 5. Réaction de polymérase en chaîne (PCR)

### 5.1 Principe

La PCR est la méthode d'amplification d'ADN la plus répandue et la mieux caractérisée. Cette méthode permet l'amplification d'une séquence spécifique d'ADN de manière exponentielle et cyclique. Chaque cycle d'amplification peut se subdiviser en trois étapes s'effectuant à des températures particulières.

La première étape, appelée dénaturation, permet l'obtention d'ADN cible sous forme de simples brins. La seconde étape concerne l'hybridation de deux oligonucléotides sur l'ADN cible dénaturé. En s'hybridant, les deux oligonucléotides vont former des amorces doubles brins reconnues par une ADN polymérase qui va initier la troisième étape, à savoir, l'élongation. Le nombre de cycles, variant entre 20 et 45, aboutit à une amplification de la séquence spécifique d'ADN comprise entre les deux amorces d'au moins un million de fois.

Dans un cycle PCR typique, l'ADN est dénaturé pendant une minute à 94°C, les amorces sont hybridées pendant une minute à une température comprise entre 40 et 65°C suivie de l'extension par l'ADN polymérase pendant une minute à 72°C. Le premier cycle est précédé d'une dénaturation initiale

pendant 3 à 5 minutes à 94°C. Quand au dernier cycle, il est suivi d'une élongation de 10 minutes à 72°C afin d'assurer la terminaison des fins de chaînes.

Afin de limiter au maximum les contaminations potentielles, nous travaillons dans trois pièces PCR différentes. Dans la première pièce, nous réaliserons le mélange PCR mais sans y ajouter l'ADN template. Celui-ci sera ajouté dans la deuxième pièce PCR. Enfin, après l'amplification, les produits PCR sont aliquotés sous hotte dans une troisième pièce.

### 5.2 Matériel

- ADN template
- Tampon PCR 10x (**Boehringer**, Mannheim, Allemagne)
- Taq Polymérase 5U/μl (**Boehringer**, Mannheim, Allemagne)
- dNTP mix 20mM (**Eurogentec**, Liège, Belgique)
- Amorces (sens et anti-sens) (**Eurogentec**, Liège, Belgique)
- Eau distillée
- Appareil PCR PE 9600 (Perkin Elmer)

### 5.3 Méthode

Chaque mix PCR de 100 μl est composé de :

- 10 μl de cDNA préalablement dilué 100x
- Tampon PCR 1x
- dNTP 800 μM
- Amorce sens 1 μM
- Amorce anti-sens 1 μM
- Eau distillée (afin d'arriver à un total de 100 μl)

Le mix PCR est réalisé dans une première pièce PCR sans y ajouter l'ADN template. Celui-ci sera ajouté dans la deuxième pièce PCR.



## 6. Transcription inverse + PCR (RT-PCR)

### 6.1 Principe

La RT-PCR ou « reverse transcriptase polymerase chain reaction » est une PCR réalisée à partir d'ARN extrait. Cette étape permet la synthèse de l'ADNc à partir de l'ARN extrait. Ensuite, cet ADNc produit est amplifié par PCR.

### 6.2 Matériel

- ARN total
- Kit Access RT-PCR System (**Promega**, Madison, USA) composé de :
  - Eau nucléase free
  - AMV Reverse Transcriptase 5U/ $\mu$ l
  - Tfl DNA Polymerase 5U/ $\mu$ l
  - Tampon AMV/Tfl 5x
  - MgSO<sub>4</sub> 25 mM
  - dNTP mix 10 mM
- Amorces (sens et anti-sens) (**Eurogentec**, Liège, Belgique)
- Appareil PCR PE 9600 (Perkin Elmer)

### 6.3 Méthode

Chaque mix PCR de 50  $\mu$ l est composé de :

- ~210 ng d'ARN total
- Tampon AMV/Tfl 1x
- dNTP 200  $\mu$ M
- MgSO<sub>4</sub> 1 mM
- Amorce sens 1  $\mu$ M
- Amorce anti-sens 1  $\mu$ M
- AMV 5U (transcriptase inverse)
- Tfl 5U (polymérase)
- Eau nucléase free (afin d'arriver à un total de 50  $\mu$ l)

Afin de limiter au maximum les contaminations potentielles, nous réalisons dans une première pièce le mélange PCR mais sans y ajouter l'ARN. Celui-ci sera ajouté dans la deuxième pièce PCR.

Dans un programme de RT-PCR classique, l'ARN est tout d'abord transcrit en ADNc durant une période de 45 minutes à 48 °C. Cet ADNc est

dénaturé à une température de 94 °C durant 2 minutes afin d'obtenir de l'ADN simple brin.

Il s'en suit 40 cycles permettant l'amplification de la séquence spécifique d'ADN d'au moins un million de fois.

Durant un cycle PCR classique, l'ADN est dénaturé pendant 30 secondes à 94 °C, les amorces sont hybridées pendant 30 secondes à une température comprise entre 40 et 65 °C suivie de l'extension par l'ADN polymérase pendant 30 secondes à 68 °C. Le dernier cycle est suivi d'une élongation de 7 minutes à 68 °C afin d'assurer la terminaison des fins de chaînes.

## 7. Transcription inverse (RT)

### 7.1 Principe

Cette étape va nous permettre de synthétiser de l'ADN complémentaire (cDNA) à partir de l'ARN extrait. Pour cela, nous allons utiliser des amorces poly-T qui vont s'hybrider à la queue poly-A des ARN messagers.

### 7.2 Matériel

- ARN messager extrait des cellules endothéliales b-END5
- Amorce poly-T 10 µM (**Eurogentec**, Liège, Belgique)
- Superscript Reverse Transcriptase 200U/µl (**Gibco Brl**, Gaithersburg, USA)
- Tampon 5x pour Superscript Reverse Transcriptase (**Gibco Brl**, Gaithersburg, USA) constitué de :
  - 25 mM tris-HCl, pH 8,3
  - 37,5 mM KCl
  - 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>
- Dithiotréitol (DTT) 0,1 µM (**Gibco Brl**, Gaithersburg, USA)
- dATP 100 nM (**Eurogentec**, Liège, Belgique)
- dCTP 100 nM (**Eurogentec**, Liège, Belgique)
- dGTP 100 nM (**Eurogentec**, Liège, Belgique)
- dTTP 10 nM (**Eurogentec**, Liège, Belgique)
- dUTP biotinylé (**Boehringer**, Mannheim, Allemagne) 1mM
- Eau Rnase free
- RNase H 2U/µl (**Gibco Brl**, Gaithersburg, USA)
- Rnasin 40U/µl (**Promega**, Madison, USA)



### 7.3 Méthode

7,5 µl d'ARN messenger sont mélangés à 2 µl d'amorces poly-T sur glace. Le tout est incubé 10 minutes à 70 °C afin de déplier l'ARN et de permettre un accrochage plus aisé de l'amorce poly-T.

Le mélange est ensuite mis sur glace pendant 5 minutes puis additionné d'un mix de 9 µl contenant :

- 4 µl de tampon pour Reverse Transcriptase
- 2 µl de DTT 0,1M
- 2 µl de mix dNTP d'un volume de 20 µl constitué de :
  - dATP 500 µM
  - dCTP 500 µM
  - dGTP 500 µM
  - dTTP 130 µM
  - dUTP biotinylé 70 µM
  - Eau RNase free (pour arriver à un volume final de 20 µl)
- 40 U de RNasin

Le tout est alors incubé 5 minutes à température ambiante.

300 U de superscript sont ajoutés au mélange. Il s'ensuit une incubation de 1h30 à 42 °C. Cette étape est réalisée deux fois.

En fin d'incubation, l'échantillon est placé 15 minutes à 70 °C pour désactiver l'enzyme. Suite à cela, l'échantillon est supplémenté de 2 U de RNase H et incubé pendant 20 minutes à 37 °C afin de détruire la matrice d'ARN.

Enfin, l'échantillon est placé 3 minutes à 95 °C afin de déplier l'ADNc. L'échantillon peut alors être conservé à -20 °C.

## 8. Electrophorèse sur gel d'agarose

### 8.1 Principe

Cette technique permet la séparation des différents fragments d'un produit PCR selon leur poids moléculaire et donc, leur taille. Elle permet de vérifier la spécificité et la sensibilité de la PCR. A pH neutre, l'ADN est chargé négativement. Si un champ électrophorétique est appliqué, l'ADN va migrer vers l'électrode chargée positivement. La séparation des différents fragments d'ADN dépend de la force de migration due au champ électrique et à la force de freinage exercée par le gel d'agarose. Cette vitesse de migration des fragments dépend de la concentration en agarose du gel.

Un pourcentage élevé en agarose (2%) permet une bonne séparation des petits fragments (de 100 à 500 bp) tandis qu'un pourcentage plus faible en agarose (1%) assure la visualisation de fragments plus grands (de 500 à 3000 bp). Cependant, la vitesse de migration des fragments dépend aussi du voltage appliqué, du tampon utilisé et du poids moléculaire de la molécule.

Pour visualiser les fragments d'ADN, nous devons ajouter du bromure d'éthidium lors de la préparation du gel. Cette molécule fluorescente s'intercale entre les bases de l'ADN et assure sa visualisation par illumination du gel sous UV à 302nm. Ensuite, l'énergie est réémise à 590 nm dans la région rouge-orange du spectre visible.

Afin d'estimer la taille des différents fragments d'ADN, nous faisons migrer en parallèle un marqueur de poids moléculaire qui servira de référence.

### 8.2 Matériel

- Agarose electrophoresis grade (**Gibco Brl**, Gaithersburg, USA)
- Tampon TBE 10x dont la composition pour un litre est :
  - 108 g de Tris (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
  - 55 g d'acide borique (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
  - 40 ml d'EDTA 0,5 M pH 8 (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
- Bromure d'éthidium 10 mg/ml (**Sigma**, St Louis, Missouri, USA)
- Bleu de bromophénol de composition :
  - glycérol 50 % (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
  - EDTA 100 mM (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
  - SDS 1 % (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
  - Bleu de bromophénol 0,1 % (**Janssen chimica**, Beerse, Belgique)
- Marqueur DNA Mass Ladder (**Gibco Brl**, Gaithersburg, USA)
- Cuve d'électrophorèse Horizon 11.14 (**Gibco Brl**, Gaithersburg, USA)
- Générateur EPS 500/400 (**Pharmacia**, Uppsala, Suède)
- Lampe UV Transilluminator UVP (**Applitek Scientific Instruments**, Deinze, Belgique)
- Appareil photo Polaroid MP.4 + Instant Camera System (USA)
- Film polaroid Typ 667 (Grande-Bretagne)

### 8.3 Méthode

La cuve d'électrophorèse est préparée en plaçant des peignes d'épaisseur voulue. 2 g d'agarose sont pesés et dilués dans 100 ml de tampon TBE 1x afin d'obtenir un gel contenant 2 % d'agarose.



Le mélange agarose-TBE est chauffé jusqu'à obtention d'une solution limpide. Ensuite, 20 µl de bromure d'éthidium y sont ajoutés. Le gel peut alors être coulé dans la cuve d'électrophorèse.

Une fois le gel polymérisé, les peignes sont enlevés et la cuve d'électrophorèse est remplie avec du tampon TBE 1x. 2µl de bleu de bromophénol sont ajoutés aux échantillons.

Les échantillons sont alors déposés dans les puits et on laisse migrer le gel pendant 45 minutes à 100 volts. Le gel pourra être ensuite visualisé sous UV, grâce au transilluminateur, et photographié.

## 9. Purification des produits PCR

### 9.1 Purification par le kit High Pure PCR Product Purification

#### 9.1.1 Principe

Les produits PCR de taille supérieure à 100 bp sont purifiés avec le kit High Pure PCR Product Purification (**Boehringer**, Mannheim, Allemagne).

La colonne de purification comporte une résine de silice permettant de retenir spécifiquement l'ADN en la présence de sels chaotropiques. Ainsi, l'ADN est séparé des impuretés telles que les sels, les amorces et les acides nucléiques libres.

#### 9.1.2 Matériel

- Produits PCR contenant les fragments d'ADN à purifier
- Colonnes High Pure PCR Product Purification kit (**Boehringer**, Mannheim, Allemagne)
- Binding buffer (**Boehringer**, Mannheim, Allemagne)
  - 3 M thiocyanate de guanidine
  - 10 mM Tris-HCl pH 6,6 (25°C)
  - 5 % éthanol
- Centrifugeuse (**Beckman JA-21**)
- Wash buffer (**Boehringer**, Mannheim, Allemagne)
  - 20 mM NaCl
  - 2 mM Tris-HCl pH 7,5 (25°C)
  - Ethanol
- Eau stérile
- Eppendorf

### 9.1.3 Méthode

500 µl de binding buffer sont ajoutés et mélangés à 100 µl de produit PCR.

Les colonnes High Pure sont placées dans les tubes collecteurs et le mélange buffer-produit PCR est déposé sur les colonnes.

Une centrifugation est ensuite réalisée à 13000 rpm durant 30 secondes. Le liquide passé dans le tube collecteur est éliminé et les colonnes sont replacées sur les tubes collecteurs. 500 µl de wash buffer sont ajoutés et une centrifugation est à nouveau réalisée pendant 30 secondes à 13000 rpm.

Le liquide passé dans le tube collecteur est à nouveau éliminé et les colonnes sont replacées sur les tubes collecteurs. 200 µl de wash buffer sont ajoutés et une centrifugation est réalisée pendant 30 secondes à 13000 rpm. Les tubes collecteurs sont ensuite jetés.

Les colonnes sont alors placées sur un eppendorf propre et l'ADN accroché à la colonne est ensuite récupéré avec 100 µl d'eau distillée, par centrifugation de la colonne à 13000 rpm pendant 30 secondes. L'éluat, contenant l'ADN purifié, est récupéré et stocké à -20°C.

## 9.2 Purification des produits PCR par Qiaquick 8

### 9.2.1 Principe

Lorsque de nombreux produits PCR de taille supérieure à 100 bp sont à purifier, on utilise le kit QIAquick PCR Purification (**Qiagen**, Hilden, Allemagne). La colonne de purification comporte une résine de silice permettant de retenir spécifiquement l'ADN en présence de sels.

### 9.2.2 Matériel

- Fragments d'ADN à purifier
- Colonnes QIAquick PCR Purification kit (**Qiagen**, Hilden, Allemagne)
- Buffer PB (**Qiagen**, Hilden, Allemagne)
- Buffer PE (**Qiagen**, Hilden, Allemagne)
- Eau stérile
- Tubes collecteurs (**Qiagen**, Hilden, Allemagne)
- Pompe aspirante



### 9.2.3 Méthode

80 ml d'éthanol sont ajoutés avant la première utilisation dans le tampon PE.

L'appareil est monté et les colonnes sont placées sur l'appareil; il est possible de placer 96 colonnes simultanément.

5 volumes de tampon PB sont ajoutés pour 1 volume de produit PCR et 600 µl du mix sont déposés par colonne. Une aspiration sera réalisée jusqu'à ce que le liquide soit totalement passé (la pompe aspirante doit être située entre -200 et -600 mbars).

1 ml de tampon PE est ajouté et, à nouveau, une aspiration sera réalisée jusqu'à ce que le liquide soit totalement passé. Cette étape sera réalisée deux fois. Ensuite, un vide maximum sera appliqué afin de sécher la membrane et ce pendant au moins 5 minutes.

Les extrémités des colonnes sont essuyées afin d'éliminer tout l'éthanol. Les tubes collecteurs sont placés à la place du bac de récupération et 80 µl d'eau (pH entre 7 et 8,5) sont ajoutés pour l'élution. Il faut ensuite attendre 1 minute puis aspirer pendant 5 minutes.

## 9.3 Purification d'ADN à partir du gel d'agarose

### 9.3.1 Principe

Quand, dans un produit PCR, il existe plusieurs bandes dont une seule nous intéresse, on peut extraire celle-ci à partir du gel d'agarose. Les produits PCR sont extraits du gel d'agarose et purifiés selon le kit QIAEX II Agarose Gel Extraction (**Qiagen**, Hilden, Allemagne).

Ce kit se base sur l'affinité qu'a l'ADN, en présence d'une forte concentration de sels, pour des billes de silice.

Après dissolution de l'agarose, et en présence d'un tampon riche en sels, l'ADN va s'adsorber sur les billes Qiaex II. Un simple lavage permettra d'éliminer les impuretés. L'ADN pourra dès lors être élué des billes avec de l'eau distillée.

### 9.3.2 Matériel

- Eppendorf
- Buffer QX1(**Qiagen**, Hilden, Allemagne)
- Billes Qiaex II (**Qiagen**, Hilden, Allemagne)
- Buffer PE

- Eau distillée
- Centrifugeuse (**Beckman JA-21**)

### 9.3.3 Méthode

La bande d'ADN d'intérêt est excisée du gel d'agarose à l'aide d'une lame propre, et placée dans un eppendorf. 300 µl de tampon QX1, puis 10 µl de QIAEX II y sont ajoutés. Le tout est incubé 10 minutes à 50 °C en vortexant toutes les 2 minutes. Le but de cette opération est de solubiliser l'agarose et d'adsorber l'ADN sur les billes.

Une centrifugation est ensuite réalisée à 13000 rpm durant 1 minute.

Le culot est ensuite resuspendu dans 500 µl de tampon QX1, puis centrifugé à 13000 rpm durant 1 minute.

Le culot est alors resuspendu dans 500 µl de tampon PE, et à nouveau centrifugé 1 minute à 13000 rpm. Cette étape est réalisée deux fois.

Le culot est ensuite séché durant 30 minutes à température ambiante, puis resuspendu dans 20 µl d'eau distillée, cette étape sert à éluer l'ADN.

Une dernière centrifugation à 13000 rpm durant 1 minute est réalisée. Le surnageant, qui contient maintenant l'ADN purifié, est alors récupéré dans un éppendorf propre.

## 10 Clonage des amplicons produits par RT-PCR

### 10.1 Principe

Nous allons utiliser le plasmide pGEM-T easy afin de cloner nos inserts. Ce vecteur linéaire possède 2 thymidines libres aux extrémités 3' capables d'augmenter fortement l'efficacité de ligation dans le plasmide, en empêchant la recircularisation du vecteur sur lui-même.

Les produits PCR amplifiés par une Taq Polymérase dont une des propriétés est de leur ajouter une adénine aux extrémités 5', vont ainsi venir se lier au plasmide.

Le vecteur pGEM-T easy possède un gène de résistance à l'ampicilline, une origine de répllication procaryote ainsi qu'un site multiple de clonage inséré dans l'élément Lac Z. Ceci est particulièrement intéressant car il permettra la sélection dite blanc-bleu entre les bactéries possédant le plasmide portant l'insert et celles dont le plasmide n'a pas incorporé d'insert.



## 10.2 Ligation des inserts dans le plasmide

Le mélange réactionnel de 10 µl au total est composé de :

- 50 ng du vecteur pGEM-T easy (**Promega**, Madison, USA)
- 2 µl d'ADN ligase (**Promega**, Madison, USA)
- Tampon de ligation : - 30 mM Tris-HCl, pH 7,8
  - 10 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 10 mM DTT
  - 1 mM ATP (**Promega**, Madison, USA)
- 2 µl d'ADN purifié

Ce mélange réactionnel est incubé 6 heures à température ambiante.

## 10.3 Préparation des bactéries compétentes

La souche bactérienne utilisée pour insérer les plasmides pGEM-T easy transformés est E. Coli Sure (**Stratagene**, La Jolla, USA). Cette souche bactérienne possède le gène de résistance à la tétracycline et le gène Lac Z $\alpha$  codant pour la  $\beta$ -galactosidase interrompu par un site de clonage multiple. Les clones recombinants sont sélectionnés et criblés selon le test blanc/bleu. Celui-ci résulte de l'activité de la  $\beta$ -galactosidase à catalyser la transformation du X-gal en un colorant bleu.

La présence d'un insert dans le site multiple de clonage interrompt le gène Lac Z $\alpha$  et comme la  $\beta$ -galactosidase n'est plus synthétisée, on obtient des colonies blanches. Les clones bactériens des colonies blanches sont alors cultivés afin d'amplifier les plasmides d'intérêt.

### 10.3.1 Matériel

- Colonies de E. Coli Sure (**Statagene**, La Jolla, USA)
- LB Broth (**Difco**, Detroit, USA)
- Agar (**Difco**, Detroit, USA)
- Tétracycline (50 µg/ml) (**Sigma**, St-Louis, USA)
- Solution de CaCl<sub>2</sub> : - 10 mM PIPES, pH 7,0 (**Sigma**, St-Louis, USA)
  - 60 mM CaCl<sub>2</sub> (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
  - 15 % glycérol (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)

### 10.3.2 Méthode

#### - Préparation du milieu Luria Bertani (LB)

Le milieu LB est composé de : - Hydrolysate de caséine (peptone) 1 %

- NaCl 0,5 %

- Extraits de levure 5 %

Il est préparé à partir d'eau distillée additionnée de 2 % de milieu LB en poudre. Il doit être autoclavé à une température de 125 °C durant 30 minutes.

Le milieu LB solide est de même composition que le milieu liquide mais il est additionné de 2 % d'agar avant la stérilisation à l'autoclave. Il est coulé dans des boîtes de pétri stériles lorsque la température est descendue à 55 °C.

Lorsque le milieu est solidifié, les boîtes sont séchées en conditions stériles.

Si un additif (antibiotique, IPTG, x-gal) doit être ajouté au milieu LB, cela se fait également lorsque la température est descendue à 55 °C.

#### - Préparation des bactéries $\text{CaCl}_2$ compétentes

Une préculture de bactéries est tout d'abord réalisée par inoculation d'une colonie d'E. Coli Sure dans 50 ml de milieu LB additionné de tétracycline. Les bactéries se développent durant une nuit à 37 °C sous agitation.

Le lendemain, 2 ml de cette préculture sont inoculés dans 250 ml de LB avec tétracycline. Cette culture se développe à 37 °C sous agitation jusqu'à ce que sa densité optique à 590 nm atteigne 0,6-0,7 (phase de croissance exponentielle).

A ce moment, 2 fois 100 ml de cette culture sont prélevés dans 2 cylindres stériles, puis incubés sur glace pendant 10 minutes.

Il s'ensuit une centrifugation de 7 minutes à 3000 rpm à 4 °C.

Les culots sont alors resuspendus dans 20 ml de la solution de  $\text{CaCl}_2$  stérile froid (4 °C), puis centrifugés 5 minutes à 2500 rpm à 4 °C. Le culot est resuspendu dans 20 ml de solution de  $\text{CaCl}_2$  froide, le tout est incubé 30 minutes sur glace.

Il s'ensuit une centrifugation de 5 minutes à 2500 rpm à 4 °C. Le culot est alors resuspendu dans 4 ml de solution de  $\text{CaCl}_2$  froide avant d'être aliquoté par 100  $\mu\text{l}$ . Les fractions ainsi obtenues peuvent être conservées à -70 °C ou utilisées directement pour une transformation.



#### 10.4 Transformation des bactéries par la méthode du choc thermique

Un aliquot de 100 µl de bactéries  $\text{CaCl}_2$  compétentes est décongelé sur glace puis le mélange de ligation est ajouté et le tout est incubé 10 minutes sur glace.

Il s'en suit un passage de 2 minutes dans un bain à 42 °C (choc thermique).

500 µl de milieu LB sont alors ajoutés à la suspension bactérienne qui est ensuite incubée 30 minutes à 37 °C avant d'être étalée sur boîtes de Pétri. Ces dernières contiennent le milieu LB solide supplémenté d'IPTG 40 µg/ml (**Promega**, Madison, USA), x-gal 40 µg/ml (**Promega**, Madison, USA) et ampicilline (**Sigma**, St-Louis, USA); ces boîtes sont incubées une nuit à 37 °C.

Les colonies blanches seront les colonies ayant inséré un plasmide portant un insert.

### 11. Mini-préparation d'ADN plasmidique

La mini-preparation d'ADN plasmidique sert à obtenir une petite quantité de plasmide purifié à partir de la culture d'un clone.

#### 11.1 Matériel

- LB Broth (**Difco**, Detroit, USA)
- Ampicilline (**Sigma**, St-Louis, USA)
- Kit miniprep de Qiagen (**Qiagen**, Hilden, Allemagne)
  - tampon P1 composé de RNase A 100 µg/ml, de Tris-HCl 50 mM et d'EDTA 10 mM
  - tampon P2 composé de NaOH 200 mM et de SDS 1 %
  - tampon P3 composé d'acétate de potassium 3,0 M pH 5,5
- Isopropanol (**Sigma**, St-Louis, USA)
- Ethanol absolu (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)

#### 11.2 Méthode

Lorsque les colonies sont visibles sur boîte de Pétri, c'est à dire le lendemain de l'étalement sur boîte, les colonies blanches sont piquées et servent à inoculer 2 ml de milieu LB additionné d'ampicilline (100 µg/ml). Il s'en suit une incubation d'une nuit à 37 °C sous agitation.

Le lendemain, 1 ml de culture est prélevé dans un microtube et centrifugé 5 minutes à 15000 rpm.

Le milieu de culture est éliminé et le culot est resuspendu dans 300 µl de tampon P1. 300 µl de tampon P2 y sont ajoutés, le tout est incubé pendant 5 minutes à température ambiante.

300 µl de tampon P3 sont alors ajoutés et le mélange est incubé 30 minutes sur glace.

Il s'ensuit une centrifugation de 15 minutes à 15000 rpm à 4 °C au terme de laquelle le surnageant est récupéré.

Après avoir estimé le volume obtenu, 0,8 volume d'éthanol sont ajoutés afin de précipiter l'ADN. Le tout est homogénéisé en agitant délicatement.

L'ADN plasmidique est culotté par centrifugation 15 minutes à 15000 rpm à 4 °C, puis lavé avec 300 µl d'éthanol 70 %.

Il est ensuite centrifugé 15 minutes à 15000 rpm à 4 °C.

L'éthanol est éliminé et le culot séché à température ambiante avant d'être resuspendu dans 20 µl d'eau désionisée et stérile.

## 12. Vérification de la construction du plasmide

Afin de vérifier que les plasmides obtenus contiennent bien l'insert attendu, plusieurs méthodes sont utilisées, à savoir :

- a) une restriction du plasmide permettant de relarguer l'insert et donc d'en vérifier la taille.
- b) une PCR interne à l'insert ou « nested PCR » qui doit générer un amplicon de taille attendue, taille qui doit être plus petite que celle de l'insert.
- c) un séquençage de l'insert contenu dans le plasmide.

### 12.1 Restriction du plasmide par Eco RI

#### 12.1.1 Matériel

- Enzyme de restriction Eco RI (**Promega**, Madison, USA)
- Tampon de restriction H (**Promega**, Madison, USA)
- Plasmide purifié (point 11)
- Eau distillée



### 12.1.2 Méthode

Le mélange de restriction dont le volume final est de 20  $\mu$ l est préparé à température ambiante :

- 5  $\mu$ l d'ADN plasmidique
- 2  $\mu$ l de tampon de restriction H : - Tris-HCl 90 mM pH 7,5
  - MgCl<sub>2</sub> 10 mM
  - NaCl 50 mM
- 1  $\mu$ l d'enzyme de restriction Eco RI
- Eau distillée

La restriction est réalisée pendant 1 heure à 37 °C.

Le produit de restriction est ensuite déposé sur un gel d'agarose 2 % pour vérifier la taille des produits de restriction.

## 12.2 Séquençage des plasmides

### 12.2.1 Principe

La technique de séquençage consiste en un séquençage utilisant un marquage en fluorescence par PCR.

Une PCR est réalisée sur le fragment à séquencer en présence d'une seule amorce spécifique de l'insert attendu (sens ou anti-sens) permettant l'amplification d'un seul brin.

Le mix PCR contient un mélange adéquat de nucléotides terminateurs marqués par un agent fluorescent. Ces nucléotides bloquent l'élongation lorsqu'ils sont insérés dans l'amplicon, tandis que des nucléotides non marqués permettent l'élongation.

La réaction PCR produit alors un ensemble d'amplicons de taille variable et terminés par un nucléotide fluorescent. Ces amplicons sont ensuite déposés sur un gel de polyacrylamide et migrent suivant leur taille.

Le profil de migration obtenu est lu par un laser qui excite les marqueurs fluorescents. Ceux-ci émettent alors un signal sous une longueur d'onde qui leur est propre, la succession des émissions donne ainsi la séquence.

Une fois la séquence obtenue, son identité est vérifiée dans une banque de donnée disponible grâce au programme informatique BLAST.

### 12.2.2 Matériel

- ADN à séquencer

- Primer (sens et anti-sens) (**Eurogentec**, liège, Belgique)
- Eau distillée
- Mix contenant la polymérase, les dNTPs, les dNTPs terminateurs fluorescents et le tampon PCR

### 12.2.3 Méthode

Les échantillons sont séquencés dans un volume de 12  $\mu$ l contenant :

- 400 ng de plasmide (portant l'ADN à séquencer)
- Amorce sens ou anti-sens 1  $\mu$ M
- Eau distillée (pour arriver à un volume final de 12  $\mu$ l)

Après ajout de tous les déoxynucléotides, la taq polymérase et le tampon, le volume final pour la réaction sera de 20  $\mu$ l.

Toutes les réactions de séquençage sont réalisées avec le même programme PCR composé de 25 cycles dont chaque cycle comprend:

- 30 secondes à 94 °C
- 15 secondes à 50 °C
- 4 minutes à 60 °C

## 12.3 PCR interne ou nested PCR pour l'obtention de trappeurs aminés

### 12.3.1 Matériel

- ADN plasmidique
- DNA polymérase (**Boehringer**, Mannheim, Allemagne)
- Buffer PCR 10x (**Boehringer**, Mannheim, Allemagne) de composition :
  - 10 mM Tris-HCl pH 8
  - 10 mM MgCl<sub>2</sub>
- dNTP 20 mM (**Eurogentec**, Liège, Belgique)
- Amorces (**Eurogentec**, Liège, Belgique)
- Eau stérile

### 12.3.2 Méthode

La première étape consiste à préparer le mélange PCR de 100  $\mu$ l contenant :

- 1  $\mu$ M pour chaque amorce (sens et anti-sens)
- 10  $\mu$ l de tampon PCR 10x
- 800  $\mu$ M de dNTP



- 100 µl d'ADN plasmidique dilué 100x
- 2,5 U Taq Polymérase

La deuxième étape consiste à lancer le programme PCR :

- 3 minutes à 94 °C
- 40 cycles : - 94 °C pendant 30 secondes
  - T° variable suivant le plasmide (57°C, 60°C, 68°C) pendant 30 secondes
  - 72 °C pendant 30 secondes
- 72 °C pendant 10 minutes
- Neutralisation à 4 °C

### 12.4 PCR interne ou nested PCR pour l'obtention de cibles biotinylées

#### 12.4.1 Matériel

- ADN plasmidique
- DNA polymérase (**Boehringer**, Mannheim, Allemagne)
- Buffer PCR 10x (**Boehringer**, Mannheim, Allemagne) de composition :
  - 10 mM Tris-HCl pH 8
  - 10 mM MgCl<sub>2</sub>
- dATP 100 mM (**Eurogentec**, Liège, Belgique)
- dCTP 100 mM (**Eurogentec**, Liège, Belgique)
- dGTP 100 mM (**Eurogentec**, Liège, Belgique)
- dTTP 100 mM (**Eurogentec**, Liège, Belgique)
- dUTP biotinylé 1 mM (**Boehringer**, Mannheim, Allemagne)
- Amorces (**Eurogentec**, Liège, Belgique)
- Eau stérile

#### 12.4.2 Méthode

La première étape consiste à préparer le mélange PCR de 100 µl contenant :

- 1 µM pour chaque amorce (sens et anti-sens)
- 10 µl de tampon PCR 10x
- 200 µM de dATP
- 200 µM de dCTP
- 200 µM de dTTP
- 200 µM de dGTP
- 50 µM de dUTP biotinylé
- 100 µl d'ADN plasmidique dilué 100x

- 2,5 U Taq Polymérase

La deuxième étape consiste à lancer le programme PCR :

- 3 minutes à 94 °C
- 40 cycles : - 94 °C pendant 30 secondes
  - T° variable suivant le plasmide (57°C, 60°C, 68°C) pendant 30 secondes
  - 72 °C pendant 30 secondes
- 72 °C pendant 10 minutes
- Neutralisation à 4 °C

### 13. Fixation des trappeurs sur la biochip

#### 13.1 Principe

Des sondes ADN immobilisées sur un support servent à la capture d'un ADN cible se trouvant en solution. L'immobilisation covalente de l'ADN sonde est obtenue par liaison de son extrémité 5' amine sur les groupements aldéhydes d'une lame de microscope en verre fonctionnalisé. Cette réaction correspond à une attaque nucléophile de l'amine primaire en position 5' de l'ADN sur le carbone de la fonction carbonyle. Cette réaction aboutit à la formation d'une imine ou base de schiff.

Les deux réactifs sont mis en présence l'un de l'autre grâce à un robot. Le robot prélève la solution d'ADN à l'aide d'une aiguille de 250 µm de diamètre. Il va ensuite la déposer (spotter) sur la lame de verre fonctionnalisée avec des aldéhydes.

#### 13.2 Matériel

- Robot (**WOW**, Naninne, Belgique)
- Aiguilles (**Genetix**, Grande- Bretagne)
- Lames aldéhyde (**AAT**, Namur, Belgique)
- 384 well plate Clear Sterile (**Nunc** , Danemark)
- Acétone (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
- SDS 10 % (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
- Borohydrure de sodium
- SSC 20x pH 5
- Eau distillée



### 13.3 Méthode

La fixation des trappeurs sur la biochips se fait en trois étapes qui sont : la préparation de la solution de fixation, la fixation proprement dite et les lavages.

#### 13.3.1 Préparation de la solution de fixation

La solution de fixation contient de l'ADN aminé à une concentration finale de 300 nM dans du tampon SSC 20x pH 5 et du SDS 0,1 %. Pour un volume de 25  $\mu$ l, il faut :

- ADN à une concentration finale de 300 nM
- 3,8  $\mu$ l de SSC 20x pH 5
- 2,5  $\mu$ l de SDS 0,1 %
- Ajuster le volume à 25  $\mu$ l avec de l'eau distillée

Ces solutions de fixation sont déposées dans une plaque 384 puits (**Nunc**, Danemark)

#### 13.3.2 Fixation proprement dite

Avant de lancer la fixation, il faut préparer et programmer le robot afin d'obtenir le design du damier désiré.

- Mettre de l'eau distillée et de l'acétone dans les bacs de rinçage
- Déposer la plaque de 384 puits contenant les solutions de fixation à la place prévue
- Déposer les lames fonctionnalisées avec des aldéhydes sur la table du robot
- Placer les aiguilles sur la tête mobile du robot
- Programmer l'ordinateur qui commande le robot.
- Démarrer le robot
- Séchage instantané après le spotting
- Attendre 1 heure à température ambiante après le spotting.

#### 13.3.3 Lavages

Afin d'obtenir de l'ADN simple brin fixé de manière covalente sur les lames de verre, nous effectuons 5 lavages. Ceux-ci sont effectués en plaçant la lame de verre dans une boîte de pétri après y avoir ajouté 20 ml de solution de lavage.

Le premier lavage se fait dans du SDS 0,2 % pendant 1 minute, suivi de deux lavages à l'eau distillée pendant 1 minute.

Vient ensuite un lavage au  $\text{NaBH}_4$  (2,5 mg/ml) dans une solution contenant 75 % de PBS et 25 % d'éthanol absolu pendant 5 minutes à température ambiante. Ce lavage vise à inactiver, par réduction, les fonctions aldéhydes qui n'ont pas réagi avec l'ADN aminé et à rendre stable le lien entre l'amine et l'aldéhyde.

Les lames sont ensuite lavées à l'eau distillée pendant 1 minute puis dénaturées dans de l'eau à 100 °C durant 5 minutes afin d'obtenir des ADN simple brin.

Finalement, les lames sont séchées et stockées à 4 °C jusqu'à utilisation.

## 14 Hybridation d'ADN sur la biochip

### 14.1 Principe

Toutes les méthodes d'hybridation font appel à la propriété que possède l'ADN dénaturé à se réassocier à sa séquence complémentaire quand les conditions (température, force ionique, etc.) sont adéquates, c'est à dire principalement lorsque la température est inférieure à la valeur de  $T_m$  (température à laquelle 50 % des duplex sont dissociés). L'hybridation comprend deux étapes dont la première est la nucléation. Cela correspond à la liaison entre de courtes séquences de bases complémentaires suite à des collisions au hasard. La deuxième étape, quant à elle, correspond à l'appariement rapide de bases adjacentes par une réaction de type « fermeture éclair » avec formation de la double hélice de Watson et Crick. Dans ce cas-ci, les réaction d'hybridation sont réalisées entre un fragment d'ADN cible en solution et un autre fragment d'ADN simple brin appelé « trappeur » qui lui, est immobilisé sur le support.

### 14.2 Matériel

- Lames portant les ADN trappeurs préalablement fixés au moyen du robot ou microarray ou biochip
- ADN cible à hybrider et marqué à la biotine
- ADN cible de CMV biotinylé 352 nM (utilisé comme contrôle positif d'hybridation)
- ADN de sperme de saumon (DSS) (**Sigma**, St Louis, Missouri, USA)
- NaOH 10 N
- Tampon phosphate 0,7M SDS 10 %
- Chambre d'hybridation



- Four à hybridation

### 14.3 Méthode

Le mélange d'hybridation contient, par damier :

- 5µl d'ADN cible
- 5µl d'ADN cible de CMV biotinylé
- 7µl de DSS 1mg/ml
- 17,5 µl de NaOH 0,1N

L'incubation est prévue 5 minutes à température ambiante, cette étape sert à dénaturer les ADN cibles double brin.

70 µl de tampon phosphate 0,7M SDS 10 % sont ensuite ajoutés.

60 µl de ce mélange sont alors déposés à l'intérieur d'une chambre d'hybridation sur le damier à la surface de la lame de verre. Les lames sont alors déposées dans des boîtes de pétri qui sont ensuite mises au four durant 2 heures.

## 15 Détection des biochips en colorimétrie

### 15.1 Principe

Cette méthode colorimétrique de détection consiste à faire précipiter de l'argent métallique à l'endroit d'une hybridation positive. En effet, l'ADN biotinylé est reconnu par une streptavidine couplée à l'or colloïdal. L'or en présence de sels d'argent et d'un réducteur catalyse la réduction de ces sels en argent métallique faisant apparaître un dépôt noir là où il y a eu hybridation. De plus, ce système permet d'amplifier le signal car il augmente, via le dépôt, la taille de la molécule marquée à détecter (Lackie, 1996). En effet, après révélation, les cristaux d'argent ont un diamètre de  $\pm 1 \mu\text{m}$ , ce qui est environ cent fois supérieur à la taille des particules d'or colloïdal qui ont environ 10 nm.

### 15.2 Matériel

- Lames sur lesquelles l'hybridation a eu lieu
- Conjugué streptavidine couplé à l'or colloïdal 10nm (**Sigma**, St Louis, Missouri, USA)
- Solution d'argent A du Silver Enhancer Kit (**Sigma**, St Louis, Missouri, USA)
- Solution d'argent B du Silver Enhancer Kit (**Sigma**, St Louis, Missouri, USA)

- Lait en poudre gloria 0,1 % (**Nestlé**, Suisse)
- Tween 20 0,1 % (**Sigma**, St Louis, Missouri, USA)
- Tampon B1 constitué de :
  - acide maléique
  - NaCl
  - NaOH (pour la mise à pH 7,5)

### 15.3 Méthode

La détection débute par 4 lavages dans du tampon B1 dilué 10x + tween 0,1% durant 1 minute. Il s'ensuit un marquage à la streptavidine couplée à l'or colloïdal diluée 1000x dans une solution de B1 + lait gloria 0,1% final. 800 µl du conjugué sont déposés sur un parafilm sur lequel on retourne la lame. Le tout est incubé 45 minutes à température ambiante.

5 lavages dans du tampon B1 dilué 10x + tween 0,1% sont effectués afin d'éliminer le conjugué qui ne se serait pas fixé.

La révélation se fait ensuite grâce à 4 passages de 10 minutes dans une solution d'argent. Celle-ci est constituée d'une solution réductrice et de sels d'argent dans un rapport 1 :1 , ces deux solutions étant mélangées au dernier moment.

Enfin, la détection se termine par un passage à l'eau.



**Résultats**  
**et**  
**Discussions**

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons choisi la technique des biochips pour suivre l'expression de certains gènes potentiellement impliqués dans l'athérosclérose. Le but final étant de comparer l'expression génique de cellules endothéliales saines avec celle de cellules provenant de lésions athérosclérotiques.

Nous avons choisi de développer une biochip « athérosclérose » en modèle murin, car la recherche fondamentale en athérosclérose recourt de plus en plus à des modèles de souris transgéniques ou "knock-out" pour des gènes codant pour des protéines telles que les apoprotéines, les récepteurs de lipoprotéines,...(Radder et Fitzgerald, 1998). Les travaux sur animaux sont complétés par des travaux sur lignées immortalisées de cellules endothéliales murines, cultivées *in vitro*. Nous disposons au laboratoire de deux de ces lignées. Ces cellules nous serviront comme source de matériel biologique pour générer les sondes de capture de la biochip. A la fin du mémoire, nous utiliserons également ces cellules pour tester la biochip sur un modèle expérimental relevant.

Notre biochips vise à mesurer l'expression d'une vingtaine de gènes dont on sait que l'expression varie au cours de la pathologie. La première partie du travail consiste à construire la biochips. Pour chacun des gènes d'intérêt, il s'agit de trouver dans les banques de données la séquence complète de l'ARNm (ou ADNc) et des amorces spécifiques à cette séquence afin d'obtenir par RT-PCR, sur l'ARN extrait de cellules endothéliales de souris, un ADN complémentaire (ADNc) spécifique. Celui-ci sera alors amplifié un grand nombre de fois, puis cloné.

A partir de ces plasmides, nous allons produire par PCR des trappeurs ou sondes de capture, que nous pourrons fixer sur la chip. L'hybridation d'ADN cible biotinylé permettra alors de tester l'efficacité et la spécificité des trappeurs en fonction de leur taille et en faisant varier les conditions d'hybridation.

Suite à cette optimisation de la chip, nous entamerons alors la dernière partie du travail qui sera l'utilisation de cette dernière. Nous pourrons effectuer une transcription inverse à partir d'ARN messagers issus soit de cellules endothéliales contrôles non stimulées, soit de cellules incubées en présence de  $\beta$ -VLDL (lipoprotéines athérogènes). Des cellules stimulées à l'interleukine-1 serviront de contrôle positif de stimulation. Ceci nous permettra après hybridation sur notre chip de déterminer l'effet des  $\beta$ -VLDL sur l'expression des gènes sélectionnés sur la chip.

Bien entendu, il s'agit d'une chip à faible densité, qu'il faudra étendre à d'autres gènes, en intégrant les données récentes de la littérature sur l'athérosclérose.



# I. Mise en oeuvre de la chip «athérosclérose » en modèle murin

Ce chapitre est consacré à la fabrication de la chip, c'est à dire à la mise au point du matériel nécessaire à la fabrication de la chips ainsi que son optimisation, étape précédant son utilisation.

Pour fabriquer des ADN trappeurs pour chaque gène d'intérêt, nous sommes passés par plusieurs étapes logiques, à savoir :

- chercher la séquence de l'ARN messenger (ou du cDNA) correspondant à une vingtaine de gènes dans les banques de données et à partir de celles-ci, sélectionner 2 amorces spécifiques qui permettront d'amplifier un fragment de  $\pm 600$  pb par RT-PCR.
- extraire de l'ARN total de cellules endothéliales de souris, ARN qui servira de matrice dans ces RT-PCR.
- réaliser les RT-PCR pour chaque gène afin d'obtenir un amplicon de 600 pb que l'on pourra ensuite cloner et vérifier par séquençage.
- synthétiser par PCR des ADN de capture à partir des ADN clonés, purifier ces trappeurs et les fixer de manière covalente sur lame de verre
- 
- l'hybridation sur damier des cibles spécifiques biotinylées des différents gènes d'intérêt obtenues par PCR pour optimiser la chips

## 1. Recherches préliminaires en banques de données

### 1.1 Recherche des séquences théoriques des gènes d'intérêt

Dans un premier temps, nous avons recherché dans les banques de données sur le réseau (Genbank) la séquence complète des ARN messagers (ou de cDNA) de différents gènes d'intérêt et ce, préférentiellement chez la souris (Fig.III.1). Ceci a été fait pour les 22 gènes suivant :

- intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)
- vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)
- E-selectine
- vascular endothelial-cadherine (VE-cadhérine)
- fibroblast growth factor-2 (FGF-2)
- platelet derived growth factor (PDGF)

- interleukine-8 (IL-8)
- macrophage chemoattractant protein-1(MCP-1)
- monocyte colony stimulating factor-1 (MCSF-1)
- endothéline
- nitric oxide synthase constitutive (NOSc)
- nitric oxide synthase inductible (NOSi)
- cyclooxygénase-2 (Cox2)
- secretory phospholipase A2 (sPLA2)
- intégrine  $\alpha 4$
- intégrine  $\alpha 5$
- intégrine  $\beta 1$
- intégrine  $\alpha V$
- cytochrome P450
- tubuline  $\alpha$
- glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase (GAPDH)
- calcium independent phospholipase A2 (iPLA2)

Les résultats de cette recherche sont illustrés à la Fig.III.1 pour VCAM-1.

Pour certains de ces gènes, nous n'avons pu trouver dans les banques de données la séquence d'ARNm chez la souris. Nous sommes donc partis de la séquence provenant d'autres espèces : c'est le cas des ARN messagers de l'interleukine-8 et de MCP-1 que nous avons trouvés dans les banques pour l'espèce humaine et de l'ARN messenger de la cyclooxygénase-2 que nous avons trouvé pour le genre *Mustela*.

Pour rappel, nous avons sélectionné une série de gènes codant pour des protéines qui semblent jouer un rôle dans le dysfonctionnement de l'endothélium aux stades précoces de l'athérosclérose. Plusieurs de ces protéines sont également induites en contexte inflammatoire, reconnu comme favorisant l'adhésion et l'infiltration des monocytes, mais aussi l'entrée des lipoprotéines dans la subendothéliale (voir chapitre de l'introduction). Ces protéines peuvent être classées en diverses catégories fonctionnelles :

- les protéines d'adhérence
- les facteurs de croissance, cytokines et chémokines
- les enzymes pro-inflammatoires
- les modulateurs du tonus vasculaire

Enfin, signalons qu'il est en plus indispensable de choisir des gènes dont l'expression est stable, quelles que soient les conditions expérimentales. C'est le cas de « house-keeping » gene ou gènes de maintenance, tels que les gènes codant pour l'alpha-tubuline du cytosquelette, pour la glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase, enzyme clef de la glycolyse ou encore pour la iPLA2 responsable de turn over naturel des phospholipides membranaires. L'expression de ces gènes est également classiquement utilisée comme référence dans la technique Northern blot (voir chapitre 2 de l'introduction).

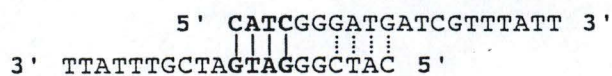


### Upper Primer Duplexes

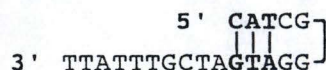
Upper Primer vcam-1 mouse mRNA:2091U20

No 3'-terminal dimer formation

The most stable dimer overall: 4 bp, -5.0 kcal/mol

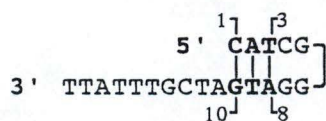


Hairpin:  $\Delta G = 1.10$  kcal/mol, Loop = 4 nt

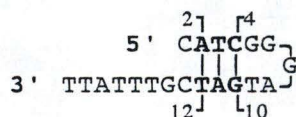


### Upper Primer Hairpin Stems

1. Duplex length = 3 bp;  $\Delta G = 1.1$  kcal/mol; loop = 4 nucleotides



2. Duplex length = 3 bp;  $\Delta G = 1.3$  kcal/mol; loop = 5 nucleotides

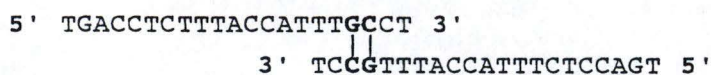


### Lower Primer Duplexes

Lower Primer vcam-1 mouse mRNA:2706L21

No 3'-terminal dimer formation

The most stable dimer overall: 2 bp, -3.1 kcal/mol



No stems longer than 2 bp.

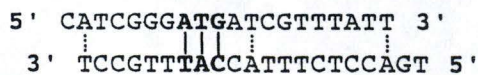
### Upper-Lower Duplexes

Primers: vcam-1 mouse mRNA:2091U20 vcam-1 mouse mRNA:2706L21

No 3'-terminal dimer formation

No 3'-terminal dimer formation

The most stable dimer overall: 3 bp, -3.4 kcal/mol



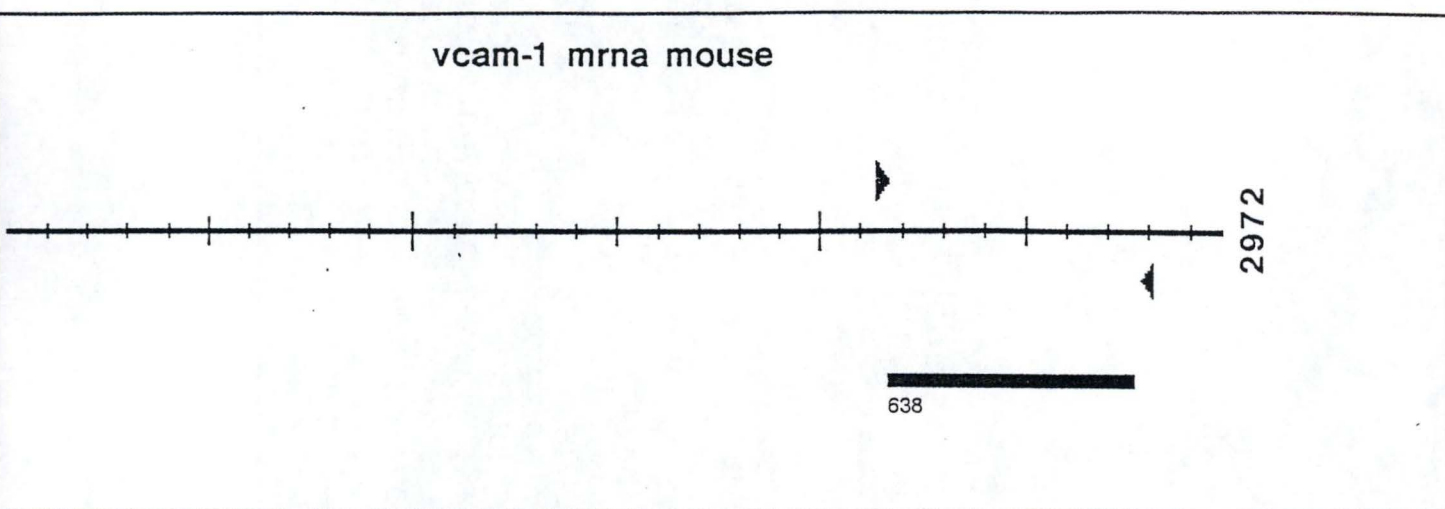


Fig. III.4. : Simulation de l'amplification par le couple d'amorces n°10 sur l'ADNc de VCAM-1 grâce au logiciel Amplify



### 1.2 Recherche des amorces

Après avoir obtenu la séquence théorique du gène d'intérêt, nous avons choisi des amorces spécifiques à cette séquence afin de permettre la synthèse par RT-PCR d'amplicons de  $\pm 600$  pb.

Le logiciel «Oligo 6 » nous a permis de sélectionner deux amorces (une amorce sens et une amorce anti-sens) spécifiques pour chacun des gènes d'intérêt (Fig.III.2). Ce logiciel permet de choisir des amorces en fonction des critères suivant :

- leur complémentarité avec la séquence à amplifier
- leur taille (environ 25 bases)
- l'absence de structures secondaires en épingle à cheveux ou « hairpin »
- l'absence de complémentarité en 3' entre elles (afin d'éviter les dimères d'amorces)
- leur stabilité interne (afin de permettre la fixation de la polymérase en 3')
- leur espacement sur la séquence cible que nous voulions aux alentours de 600 pb et de préférence près de l'extrémité 3' de l'ARN messager
- leurs températures de fusion ( $T_m$ ) qui doivent être proches

Afin de confirmer la spécificité des amorces sens et anti-sens sur le fragment à amplifier, ces amorces sont préalablement testées pour leur reconnaissance vis-à-vis des banques de données d'acides nucléiques via le programme « Blast. ». Pour chaque paire d'amorces choisie, on obtient 100 % d'identité avec la séquence théorique murine. Ceci est illustré pour VCAM-1 à la Fig.III.3 a et b. Des scores plus faibles sont obtenus pour des séquences provenant d'autres espèces et nettement plus faibles pour des séquences non apparentées. Ceci montre bien la spécificité des amorces choisies.

Une simulation de l'amplification par les amorces sens et anti-sens peut être obtenue grâce au logiciel « Amplify ». Ce logiciel simule une amplification par PCR et nous permet de connaître la spécificité des amorces au niveau du fragment à amplifier mais aussi de prédire quels fragments sont générés, ceux qui sont désirés et ceux qui sont contaminants (Fig.III.4).

Pour une question de facilité, nous prendrons l'exemple d'un gène, à savoir VCAM-1, en sachant que la même procédure a été utilisée pour chacun des gènes. L'ensemble des paires d'amorces sélectionnées sur base de la démarche décrite ci-dessus est renseigné dans le tableau III.1.



## **2 Extraction d'ARN total de cellules en culture**

Cette étape consiste à extraire l'ARN total de cellules endothéliales murines b-END5 en culture. Pour la plupart des extractions, nous avons utilisé des cellules endothéliales non stimulées. Nous avons également fait une extraction sur cellules stimulées par l'interleukine-1, car parmi les 22 gènes sélectionnés, certains gènes ne sont pas ou faiblement exprimés dans les cellules au repos (par exemple, les gènes codant pour la COX-2, VCAM-1,...). Cette extraction a été réalisée avec le kit SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, USA).

Une fois extrait, nous quantifions l'ARN au spectrophotomètre, ce qui permet d'estimer sa concentration ainsi que sa pureté. En effet, la quantification de l'ARN total extrait est déterminée au spectrophotomètre par lecture de l'absorbance à la longueur d'onde de 260 nm. L'absorbance à 280 nm reflète la quantité de protéines dans l'échantillon. Le ratio entre l'absorbance à ces deux longueurs d'onde (260nm/280nm) indique la pureté de l'ARN total. Les résultats sont illustrés au tableau III.2. Toutes ces quantités d'ARN ont été obtenues à partir de cellules provenant d'une boîte T75, chacune de ces T75 étant subconfluente.

Au vu de ces résultats nous pouvons conclure que l'ARN total obtenu a une pureté convenable. Nous pouvons également estimer la quantité d'ARN que nous récupérons en fonction du nombre de cellules en culture, sachant qu'une T75 subconfluente contient environ 12 millions de cellules.

Au niveau des concentrations, on remarque qu'il y a de grandes variations au niveau des quantités d'ARN recueillies à partir des cellules contrôles. Lors de l'extraction d'ARN, une des étapes consiste à faire précipiter les protéines, afin de les éliminer, en chauffant les eppendorfs à 70 °C. Nous pensons que la différence de quantité d'ARN recueillie est due à un échange de chaleur différent. En effet, pour la première extraction (concernant les cellules contrôles et les cellules stimulées à l'IL-1), nous avons utilisé un bain marie à 70 °C (voir Matériels et méthodes Point 3.2) alors que pour les autres extractions nous avons utilisé un bloc chauffant.

## **3. Production d'amplicons d'environ 600 pb par RT-PCR**

### **3.1 RT-PCR**

La RT-PCR est une technique composée de deux étapes : une transcription inverse d'un ARN en un ADN complémentaire (ADNc) et une amplification par PCR de l'ADNc (cfr. Matériels et méthodes Point 6.1).

Les paires d'amorces choisies précédemment donnent lieu après RT-PCR à des amplicons d'environ 600 paires de bases. Le poids moléculaire de chaque



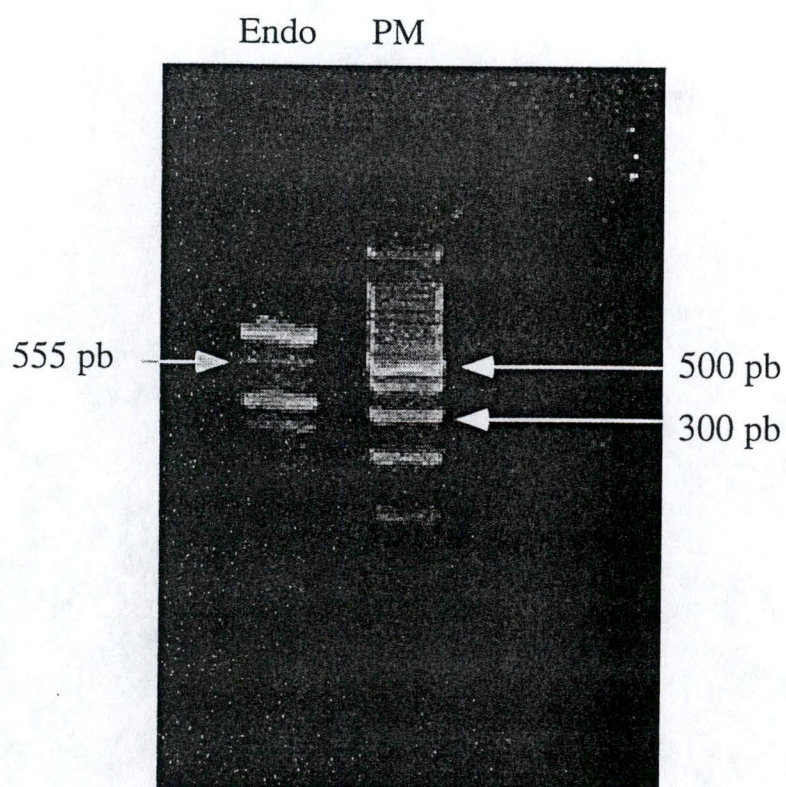


Fig.III.6 : Profil électrophorétique en gel d'agarose 2%, obtenu pour les produits RT-PCR, avec les amorces spécifiques pour l'endothéline-1. La taille attendue pour l'amplicon est de 555pb

amplicon est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 2 %. Les bandes obtenues sont comparées au marqueur de poids moléculaire « 100 pb DNA ladder » de chez Promega. Ceci a été réalisé pour 17 gènes et est illustré pour la GAPDH à la Fig.III.5. La bande obtenue pour le gène de la GAPDH correspond bien à la taille attendue de 614 pb.

Toutefois, pour un certain nombre de ces gènes, nous avons rencontré différents types de problèmes : la première difficulté rencontrée pour certains amplicons est le manque de spécificité : plusieurs bandes sont présentes sur le gel d'agarose, y compris la bande d'intérêt mais l'intensité de celle-ci est très faible. Ceci a été rencontré pour les gènes suivants : ICAM-1, NOSi, FGF-2, NOSc, Endothéline-1, Intégrine  $\beta 1$  et est illustré pour l'endothéline-1 à la Fig.III.6 .

Sur cette photo de gel d'agarose d'endothéline-1, nous observons 4 bandes : 2 bandes bien visibles à environ 700 et 350 pb et 2 autres bandes dont l'intensité est plus faible aux alentours de 300 et 550 pb. La bande d'endothéline-1 qui nous intéresse a une taille de 555 pb.

Afin d'augmenter la spécificité de la RT-PCR, nous avons fait varier plusieurs paramètres , de la manière suivante :

- la concentration en  $MgSO_4$  a été diminuée de moitié (on passe de 1  $\mu M$  à 0,5  $\mu M$ )
- la concentration en primers a été diminuée (on passe de 1  $\mu M$  à 0,8  $\mu M$ )
- la concentration en polymérase a été diminuée de moitié
- la température d'annealing a été augmentée de 15 °C (on passe de 50 à 65 °C)

Ceci est illustré à la Fig.III.7. On remarque qu'une simple augmentation de la température d'annealing augmente déjà la spécificité de la PCR. En effet, on ne retrouve plus que 2 bandes au lieu de 4, et la bande d'intérêt, dont la taille est de 555 pb, est présente de façon plus intense.

Une concentration diminuée en  $MgSO_4$  et en amorces tend à augmenter l'intensité des bandes, à l'exception du résultat E2 pour lequel aucune bande n'est observée.

Ainsi, il est dès lors plus facile d'extraire la bande qui nous intéresse du gel d'agarose afin de la purifier.

D'autre part, pour l'amplification par RT-PCR d'autres ARNm tel l'ARNm pour l'IL-8, nous avons rencontré un problème d'efficacité de RT-PCR : lors d'une première RT-PCR effectuée sur de l'ARN total provenant de cellules non stimulées, aucune bande attendue de 600 pb n'apparaissait.

Afin de résoudre ce problème d'efficacité, nous avons augmenté la concentration en  $MgSO_4$  et nous avons recommencé la RT-PCR sur de l'ARN total provenant de cellules stimulées à l'interleukine-1. En effet, un certain nombre de gènes ne sont exprimés qu'après une stimulation (NOSi, COX2, MCP-1, IL-8) . Un exemple est illustré à la Fig.III.8 pour l'IL-8. Les résultats



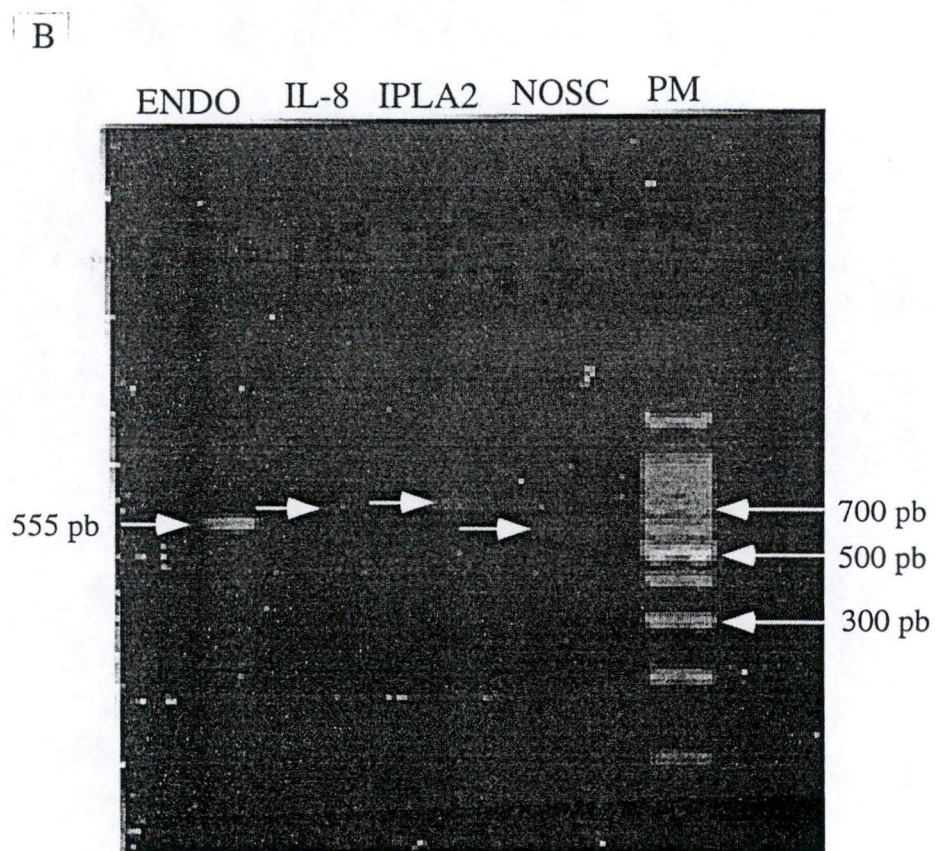
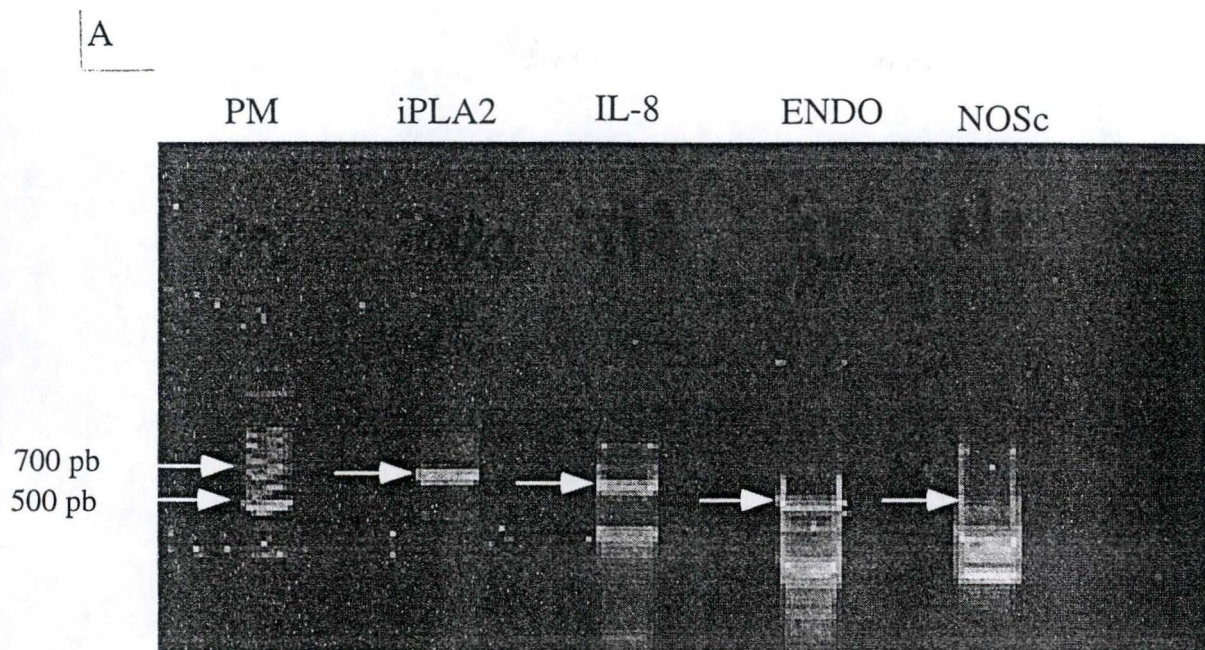


Fig.III.9 : Electrophorèse sur gel d'agarose 2% de produits de RT-PCR obtenus avec les amorces spécifiques des gènes iPLA2, Il-8, Endothéline-1 et NOSc Analyse avant (A) et après extraction du gel (B)



obtenus montrent que la bande d'intérêt, dont la taille est de 647 pb, est présente lorsque la concentration en  $\text{MgSO}_4$  est comprise entre 2 et 2,5  $\mu\text{M}$ .

Il est à remarquer aussi que nous avons obtenu les amplicons de 600 pb correspondants aux ARNm pour l'IL-8, le MCP-1 et la COX-2 de souris, en utilisant des amorces spécifiques des séquences humaines (IL-8, MCP-1) ou de mustela (COX-2).

En conclusion, nous avons obtenu des amplicons d'environ 600 pb pour 17 des 22 gènes d'intérêt.

### **3.2 Purification et quantification sur gel des produits de RT-PCR**

Les bandes d'intérêt sont extraites des gels d'agarose afin de récupérer uniquement la bande d'intérêt. Elles sont ensuite purifiées avec le kit QIAEX II Agarose Gel Extraction de chez Qiagen (cfr. Matériel et méthodes Point 9.3.1).

La taille des fragments purifiés a été estimée sur gel d'agarose 2 % par comparaison avec un marqueur de poids moléculaire de référence, le 100 pb DNA Ladder (Promega, Gaithersburg, USA). Ceci est illustré à la Fig.III.9 pour 4 gènes : iPLA2, IL-8, Endothéline-1 et NOSc. Après extraction et purification des bandes d'intérêt, on observe une seule bande correspondant au gène d'intérêt.

Ceci a été réalisé pour les 17 produits de RT-PCR décrites ci-dessus.

### **3.3 Amplification par PCR des amplicons de 600 pb**

En vue du clonage et afin d'obtenir une quantité de matériel plus importante, nous avons réamplifié par PCR, avec les mêmes amorces que celles utilisées pour la RT-PCR (cfr. Matériel et méthodes Point 5.1) chaque amplicon obtenu précédemment.

Afin de contrôler leur taille et leur pureté, les échantillons PCR sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2 %. Ceci est illustré pour 9 gènes différents à la Fig.III.10.

### **3.4 Clonage des amplicons**

Les échantillons de 600 pb obtenus ont été purifiés avec le kit High Pure PCR Product (voir Matériels et méthodes Point 9.1) pour chaque gène d'intérêt afin d'éliminer les amorces et les nucléotides pouvant gêner le clonage. Ils ont ensuite été insérés par ligation dans le plasmide pGEM-T easy, illustré à la Fig.III.11. Le plasmide est ensuite introduit dans des bactéries *E.coli* Sure



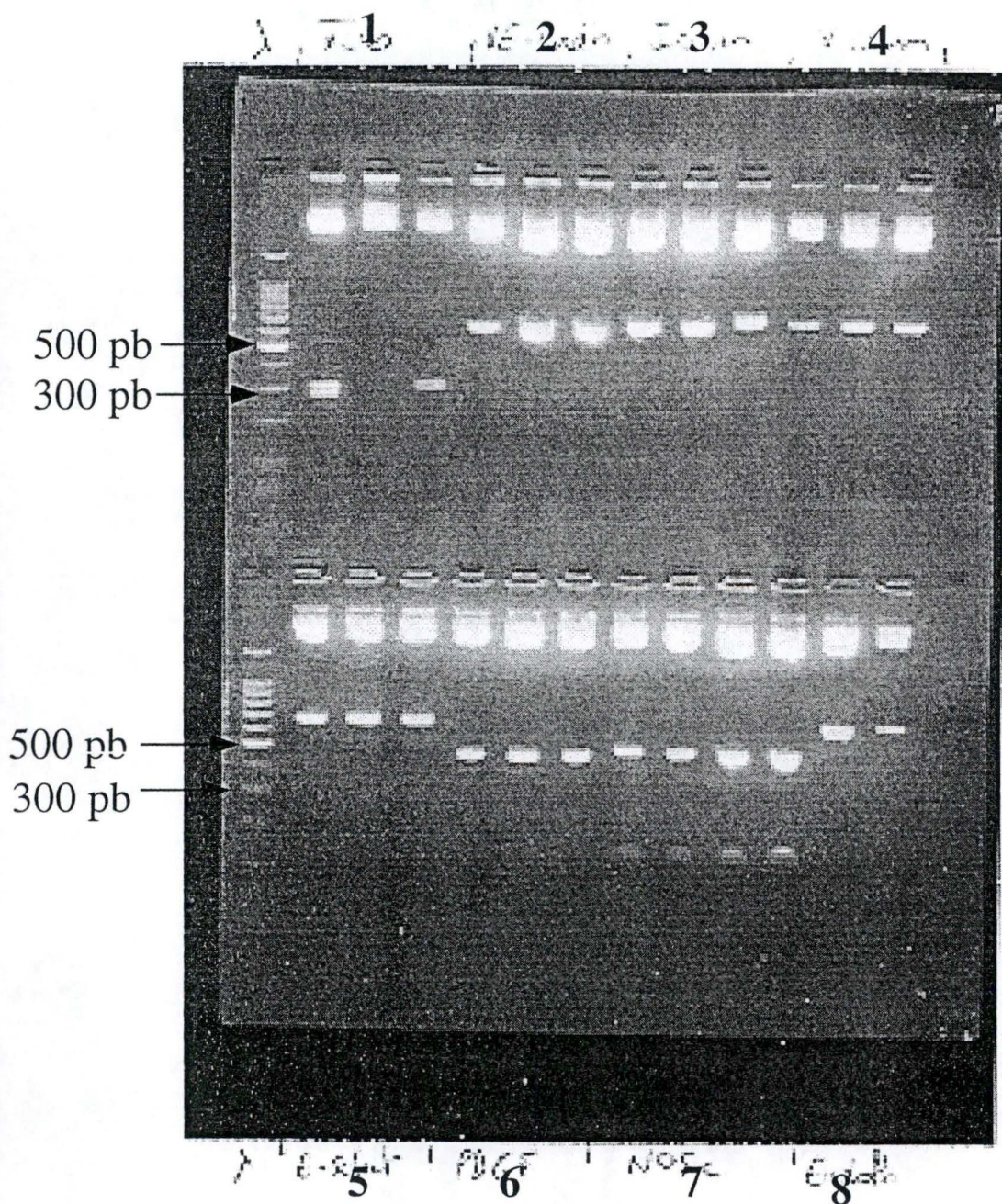


Fig.III.12 : Profil de restriction des clones obtenus par l'enzyme EcoRI pour récupérer les inserts d'environ 600 pb, correspondants aux gènes suivants :

1. Tubuline Alpha
2. VE-Cadhérine
3. ICAM-1
4. VCAM-1
5. E-Sélectine
6. PDGF
7. NOSc
8. Endothéline



rendues compétentes avec du  $\text{CaCl}_2$ , puis transformées par la technique du choc thermique. La sélection est ensuite réalisée sur milieu additionné d'ampicilline, de X-gal et d'IPTG. En effet, le vecteur pGEM-T easy permet une sélection dite blanc-bleu suivant que l'insert a été ou non incorporé dans le vecteur. Les colonies dont le vecteur ne contient pas d'insert deviendront bleues sur milieu X-gal, tandis que les autres contenant un vecteur avec un insert resteront blanches. Les colonies blanches sont ensuite récupérées et mises en culture liquide dans du milieu LB avec ampicilline.

Des mini-préparations d'ADN plasmidique sont ensuite réalisées (cfr. Matériel et méthodes Point 11.1). Pour cela, nous avons choisi 3 colonies blanches pour 12 des 17 gènes à savoir la tubuline alpha, VE-Cadhérine, ICAM-1, VCAM-1, E-Sélectine, PDGF, NOSc, endothéline, COX-2, GAPDH, intégrine alphaV et iPLA2, et ce afin de s'assurer qu'au moins un clone porte bien l'insert d'intérêt pour chaque gène. Il est à noter que pour la iPLA2, nous n'avons obtenu que 2 colonies blanches.

### 3.5 Vérification du clonage

Connaissant l'ensemble des sites de restriction du vecteur, nous avons réalisé des restrictions par l'enzyme EcoRI afin de vérifier si les inserts d'intérêt ont bien été insérés dans le vecteur. En effet, cette enzyme restreint le plasmide au site d'insertion de l'amplicon de 600 pb. La taille du vecteur est de 3018 pb. Ceci a été fait pour chacun des trois clones correspondant à 12 gènes et est illustré à la Fig.III.12.

Nous retrouvons deux bandes dans le profil de restriction, la plus grande correspond au vecteur, la plus petite à l'insert. Pour les clones 1 et 3 de tubuline alpha, le profil de restriction montre un total de trois bandes, celle du vecteur de grande taille et deux plus petites qui correspondent à l'insert, lui-même possédant un site EcoRI. Chaque clone contient un insert de taille attendue, à l'exception du clone 2 de tubuline alpha et du clone 1 d'endothéline-1. Ceci a uniquement été réalisé pour les gènes dont nous avons obtenus des colonies, à savoir : tubuline alpha, VE-Cadhérine, ICAM-1, VCAM-1, E-Sélectine, PDGF, NOSc, endothéline, COX-2, GAPDH, intégrine alphaV et iPLA2.

Un séquençage (cfr. Matériel et méthodes point 12.3.1) est réalisé sur les différents inserts (Fig.III.13 a et b). Ces séquences sont ensuite comparées aux séquences théoriques. Ceci nous a permis de confirmer que chaque insert avait la séquence attendue.

A ce stade du travail, nous avons donc des clones contenant chacun une séquence de  $\pm 600$  pb, spécifique de 12 gènes d'intérêt.



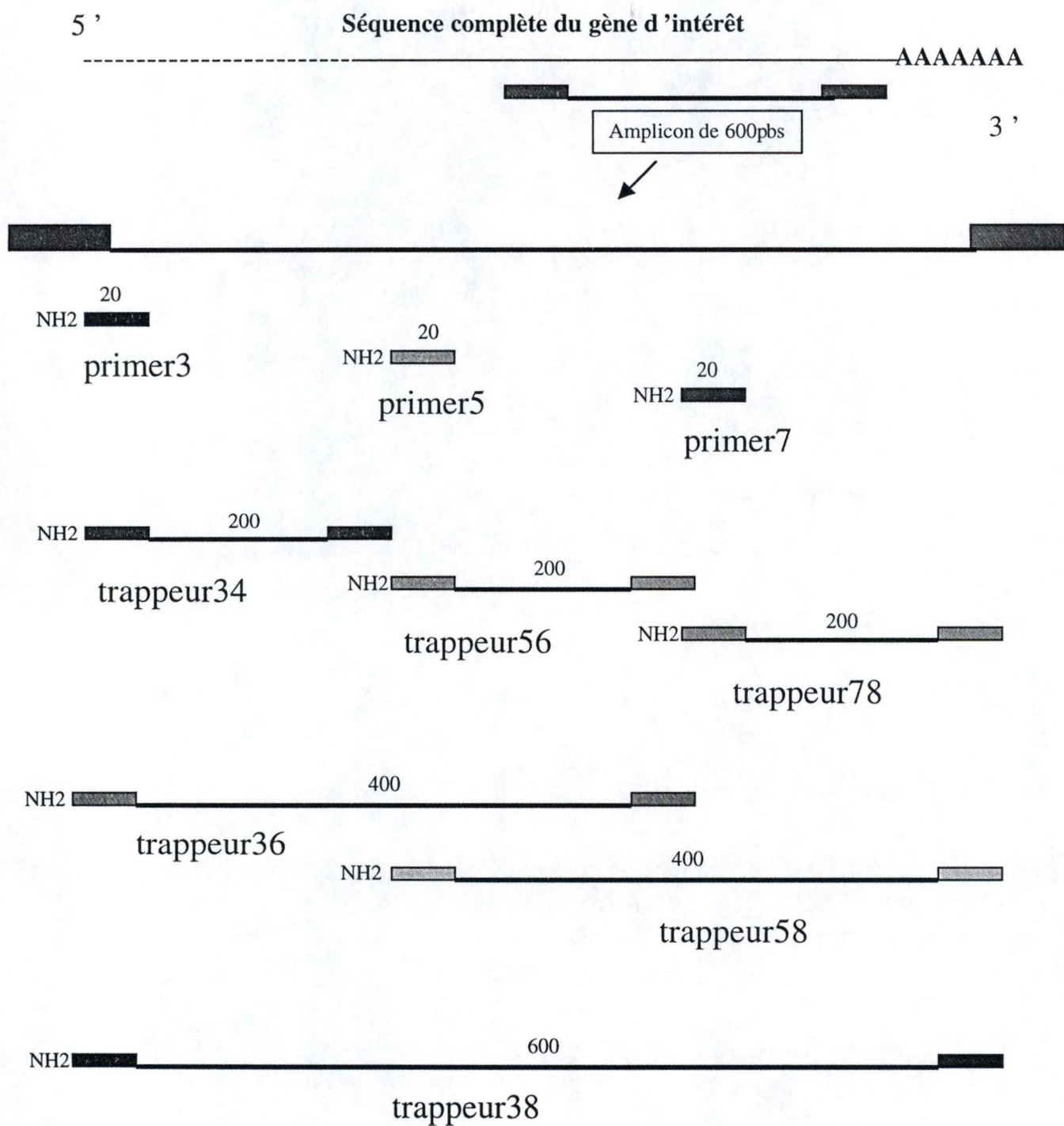


Fig. III.14 : schéma représentant les tailles et les emplacements des différents trappeurs produits par PCR

### **4. Optimisation de l'étape d'hybridation avec des trappeurs cibles sur VCAM-1 et ICAM-1**

Maintenant que nous avons des clones contenant des inserts de  $\pm 600$  pb pour 12 gènes d'intérêt, nous allons les utiliser comme matrice pour générer par nested PCR des ADN trappeurs de taille variable pour voir l'influence éventuelle de la taille ainsi que de la position de ces ADN trappeurs sur l'efficacité et la spécificité de l'hybridation.

A partir de la séquence de chaque amplicon de 600 pb obtenu par RT-PCR, le logiciel « Oligo 6 » nous a permis de trouver de nouvelles amorces sens et anti-sens spécifiques à cet amplicon. L'ensemble des paires d'amorces sélectionnées est renseigné dans le tableau III.3.

#### **4.1 Amplification de trappeurs de différentes tailles par PCR**

Afin d'optimiser le système, nous avons d'abord étudié l'influence de différentes tailles de trappeurs sur l'efficacité de l'hybridation. Pour cela, trois paires d'amorces seront choisies afin de permettre la synthèse de trappeurs de 200, 400 et 600 pb. Ceci n'a été réalisé que pour les amplicons correspondant à ICAM-1 et VCAM-1.

L'amplification des ADN trappeurs a été réalisée d'une part avec une amorce sens portant une amine à l'extrémité 5', ceci afin de réaliser ultérieurement la fixation covalente sur lame de verre, et, d'autre part, avec une amorce anti-sens spécifique.

Des trappeurs de différentes tailles portant une amine sur un de leur brin à l'extrémité 5' ont été obtenus. Cette fonction chimique permettra la fixation covalente du brin d'ADN aminé sur une lame de verre préalablement fonctionnalisée avec des aldéhydes. Les amorces sens, de  $\pm 25$  bases, étant aminées, pourront être utilisées comme ADN trappeur et donc elles seront incluses dans l'étude d'influence de la taille des trappeurs sur l'hybridation. La figure III.14 reprend sous forme de schéma les tailles et emplacement de ces différents trappeurs par rapport à l'amplicon de 600 pb.

Les trappeurs de différentes tailles ainsi obtenus sont analysés sur gel d'agarose 2 %. Ils correspondent effectivement à la taille attendue. Nous obtenons 3 trappeurs de  $\pm 200$  pb, 2 trappeurs de  $\pm 400$  pb et un trappeur de  $+600$  pb pour ICAM-1. Pour VCAM-1, seuls 2 trappeurs de  $\pm 200$  pb ont été obtenus, 2 trappeurs de  $\pm 400$  pb et un trappeur de  $\pm 600$  pb. Les différents trappeurs obtenus pour VCAM-1 sont illustrés à la Fig.III.15. Ces trappeurs sont ensuite purifiés selon le kit High Pure PCR Product Purification (cfr. Matériels et méthodes Point 9.1) afin d'éliminer les amorces aminées pouvant entrer en compétition lors de la fixation, et quantifiés. Ils peuvent alors être spottés sur les lames de verre fonctionnalisées avec des aldéhydes.



### **II. Fixation des ADN trappeurs de différentes tailles**

La fixation des différents trappeurs est réalisée grâce à un robot. Celui-ci va prélever la solution de trappeurs dans une plaque multipuits (chaque puit correspondant à une solution de trappeur différente) à l'aide d'une aiguille de 250  $\mu\text{m}$  de diamètre. Il va ensuite la déposer (spotter) sur la lame de verre fonctionnalisée avec des aldéhydes, s'en suit la formation d'un lien covalent entre la lame et le trappeur (cfr. Matériel et méthodes point 13.3).

Un damier va être réalisé, permettant de tester différentes tailles de trappeurs à des concentrations différentes afin d'optimiser le système. Ceci a été tester pour deux gènes : *Icam-1* et *Vcam-1*.

Un premier damier de 8 sur 15 a été réalisé où chaque ligne représente un type de trappeur. Les 4 premières colonnes représentent les différents trappeurs de *Icam-1*, les 4 suivantes ceux de *Vcam-1*. Nous avons donc 4 répliquats pour chaque type de trappeur (Fig.III.16).

Pour chaque gène, nous testons des trappeurs de  $\pm 20$ , 200, 400 et 600 pb. Les ADN trappeurs de 200, 400 et 600 pb sont fixés à une concentration finale de 150 nM tandis que ceux de 20 pb sont fixés aux concentrations de 150 et 600 nM. En ce qui concerne les ADN trappeurs de 200 pb de *Vcam-1*, seuls deux trappeurs sur trois ont été obtenus.

Le damier est délimité de part et d'autre par des contrôles de fixation. Ceux-ci correspondent à de l'ADN trappeur de CMV aminé et biotinylé. Ces spots devront obligatoirement s'allumer si la fixation des ADN trappeurs a bien eu lieu.

Un contrôle d'hybridation positif correspondant à un trappeur de CMV aminé est utilisé afin de vérifier si l'hybridation a bien eu lieu.

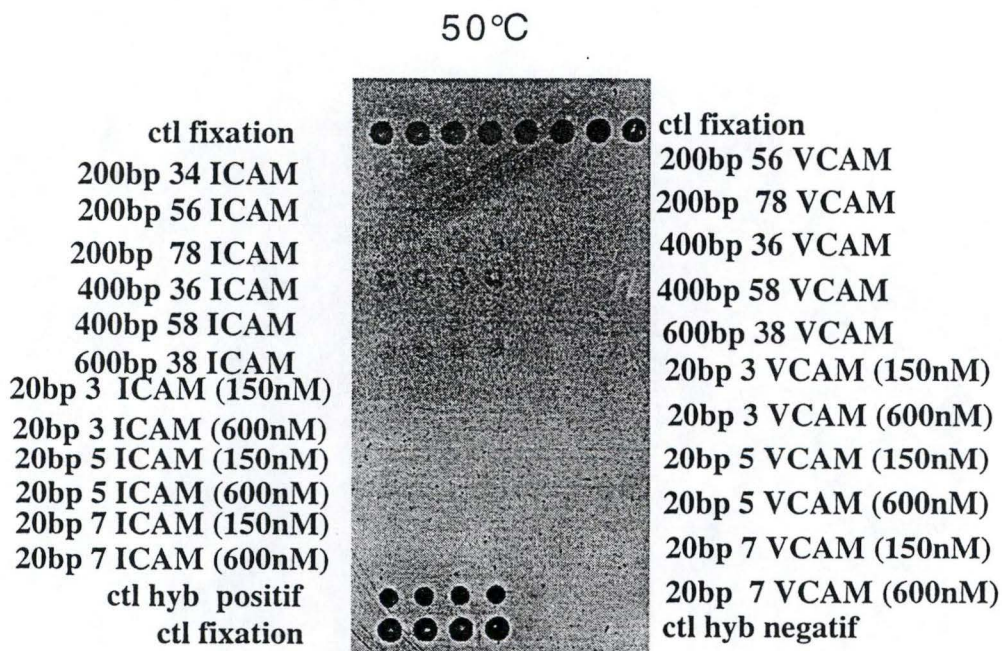
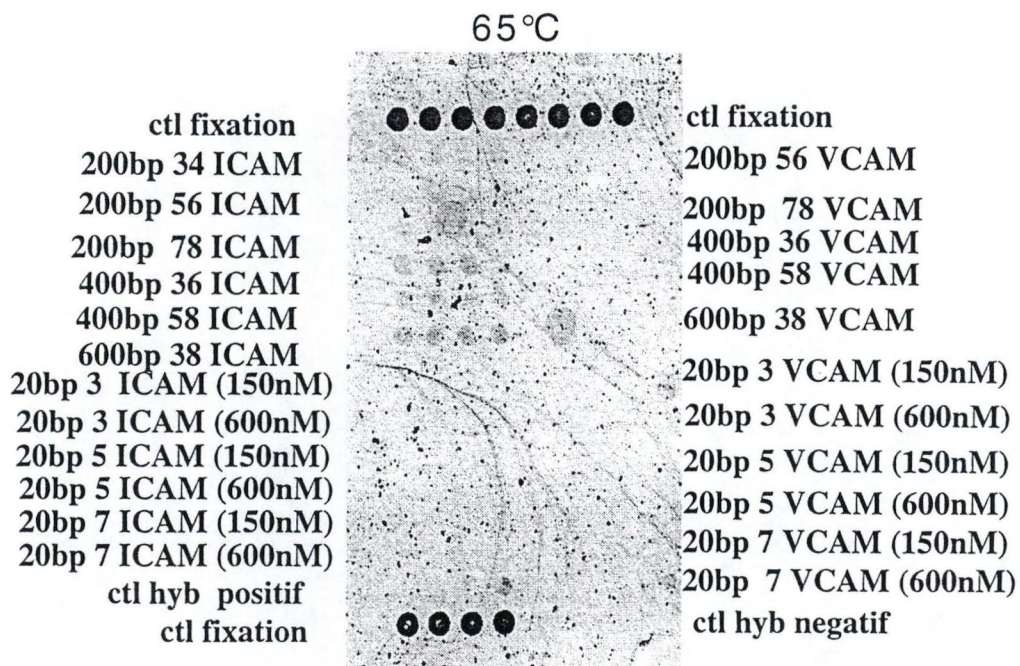
Enfin, nous utilisons un contrôle d'hybridation négatif correspondant à un ADN trappeur HIV aminé. Ces spots ne doivent jamais s'allumer s'il y a bien spécificité lors de l'hybridation.

### **III. Hybridation sur les damiers portant des trappeurs de différentes tailles**

Des ADN cibles multibiotinylés ont été amplifiés par une paire d'amorces (une amorce sens et une amorce anti-sens) à partir des clones obtenus pour *VCAM-1* et *ICAM-1*. Ces cibles biotinylées seront utilisées pour tester l'hybridation. Le principe de l'hybridation sur biochips a été décrit dans le matériel et méthodes.

La manipulation consiste en l'hybridation des deux cibles *ICAM-1* et *VCAM-1* à deux températures sur le damier du point 4.2.





FigIII.18a et b : Hybridation de cibles ICAM-1 sur le damier représenté à la Fig.III.16, à 65°C (a) et à 50° C (b)

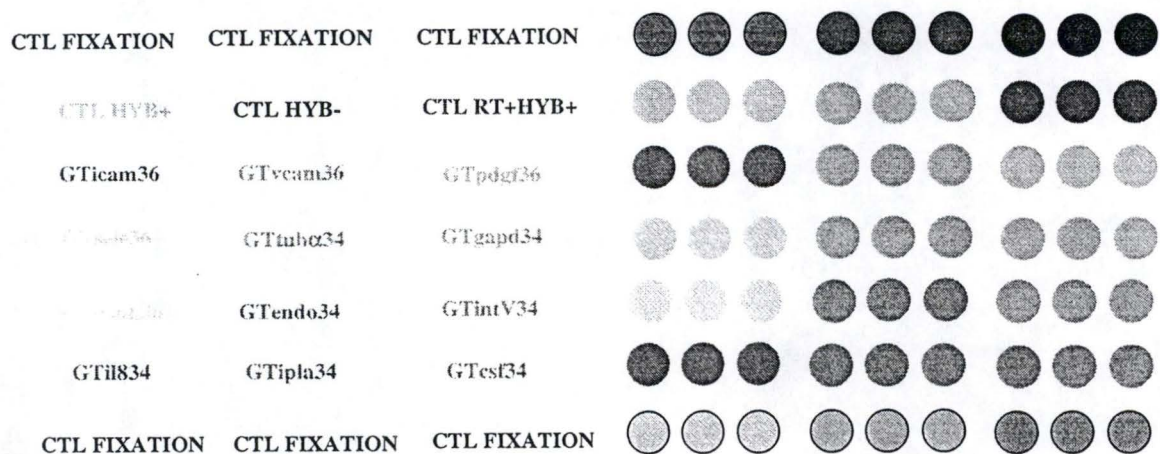


Les résultats obtenus (Fig.III.17 a et b, 18 a et b) montrent que les contrôles de fixation s'allument, ce qui signifie que la fixation des ADN trappeurs sur la lame de verre a bien eu lieu. Le contrôle d'hybridation positif s'allume ce qui montre que les conditions utilisées permettent une reconnaissance entre séquences complémentaires, tandis que le contrôle d'hybridation négatif ne donne aucun signal (aucun spot visible), ce qui montre qu'il n'y a pas d'hybridation non spécifique. L'hybridation est spécifique car les cibles ICAM-1 et VCAM-1 ne se fixent que sur leurs trappeurs respectifs.

En ce qui concerne les différentes tailles de trappeurs testées, nous constatons que seuls les trappeurs de 200, 400 et 600 pb donnent lieu à des signaux détectables, les trappeurs de 400 et 600 pb s'hybridant de façon plus efficace que les trappeurs de 200 pb. Par contre, nous n'observons aucune hybridation pour les amorces de 20 bases quelle que soit la concentration testée. Par contre, nous constatons que les trappeurs de 200, 400 et 600 pb permettent une hybridation efficace quand ils sont spottés à une concentration de 150 nM.

Cette manipulation a été réalisée à 65°C mais aussi à 50°C. En effet, les températures de melting de tous ces trappeurs de tailles variables sont très différentes. On peut donc supposer que les résultats d'hybridation seront différents pour tous ces trappeurs aux 2 températures d'hybridation que l'on va tester (50°C et 65°C). Au vu des résultats (fig.17 et 18) on peut se rendre compte que même à 50°C, aucune hybridation n'est visible sur les trappeurs de petites tailles. De même que à 65°C, les trappeurs de grande taille permettent une hybridation efficace. Une autre remarque importante au vu de ces résultats est que le bruit de fond est plus intense quand l'hybridation a eu lieu à 50°C. Tous ces résultats confirment ceux avancés par Aurélie Berthe (DES 1999) qui avait réalisé le même type de manipulations pour les gènes PDGF, E-selectine et VE-cadherine et avait montré que des trappeurs de 400bp spottés à une concentration de 150nM donnaient des résultats d'hybridations très satisfaisants lors d'une hybridation de 2 heures à 65°C.

En conclusion, nous avons donc montré l'influence de la taille des trappeurs sur l'efficacité d'hybridation. Par contre, la place de ces mêmes trappeurs par rapport à l'ADN cible n'a pas l'air d'influencer de manière importante les résultats d'hybridations. Nous allons donc continuer la réalisation de nos damiers avec des trappeurs de  $\pm$  400bp proches de la queue poly A de l'ARNm. Comme l'équipe de F. De Longueville a montré au laboratoire que la concentration en trappeurs de 400 bp devaient être comprise entre 150nM et 600nM pour donner une efficacité maximale, nous continuerons donc nos spotting à une concentration de 300nM.



FigIII.20 : Représentation du damier permettant de tester la spécificité de l'outil. Le damier est délimité par une courbe de concentration (de 10 à 150 nM) en contrôle de fixation.

Le contrôle de fixation correspond de l'ADN trappeur de CMV biotinylé.

Le contrôle d'hybridation positif correspond à un ADN trappeur de CMV aminé.

Le contrôle d'hybridation négatif correspond à un ADN trappeur du gène fem de Staphylocoque.

Les différents trappeurs sont à une concentration de 300 nM.



### **5. Production d'une chip à 12 trappeurs**

#### **5.1 Production des trappeurs de 400 pb pour les 10 autres gènes**

Suite aux résultats précédents obtenus pour VCAM-1 et ICAM-1, des ADN trappeurs d'environ 400 pb ont été synthétisés par PCR pour les 10 autres gènes clonés avec une paire d'amorce (une amorce sens portant une amine à l'extrémité 5' et une amorce anti-sens spécifique). Ceci a été réalisé pour les 10 gènes suivants :

- PDGF
- sélectine
- tubuline  $\alpha$
- GAPDH
- VE-Cadhérine
- Endothéline-1
- Intégrine  $\alpha V$
- iPLA2
- Il-8
- CSF-1

Les trappeurs ainsi obtenus sont visualisés sur gel d'agarose 2%. La figure III.19 nous montre les résultats de production de trappeurs pour 6 gènes. Ces trappeurs correspondent effectivement à la taille attendue. Ces trappeurs sont ensuite purifiés avec le kit High Pure PCR Product Purification (cfr. Matériels et méthodes Point 9.1).

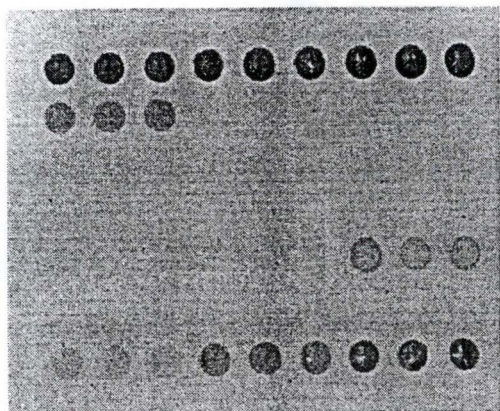
#### **5.2 Fabrication d'un damier portant les trappeurs de 400 pb pour 12 gènes**

Un damier, de 9 sur 7, a été réalisé (Fig III.20). Ce damier est délimité de part et d'autre par une courbe de concentration en trappeurs allant de 10 nM à 150 nM pour les contrôles de fixation. Ceux-ci correspondent à de l'ADN trappeur de CMV biotinylé. Ces spots doivent obligatoirement s'allumer si la fixation des ADN trappeurs a bien eu lieu. Cette courbe de concentration est utilisée afin d'obtenir des signaux correspondant à des niveaux de gris différents selon la concentration. Ceci permettra de normaliser la détection.

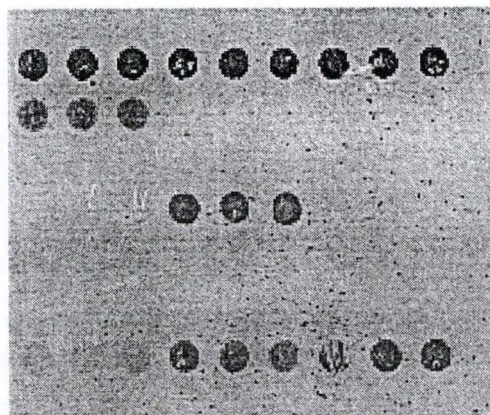
Un contrôle d'hybridation positif correspondant à un ADN trappeur de CMV aminé est utilisé afin de vérifier si l'hybridation a bien eu lieu.

Contrairement au damier précédent, le contrôle négatif d'hybridation est réalisé avec un ADN trappeur de *femA* de staphylocoque. Ces spots ne devraient jamais s'allumer lors d'une hybridation.

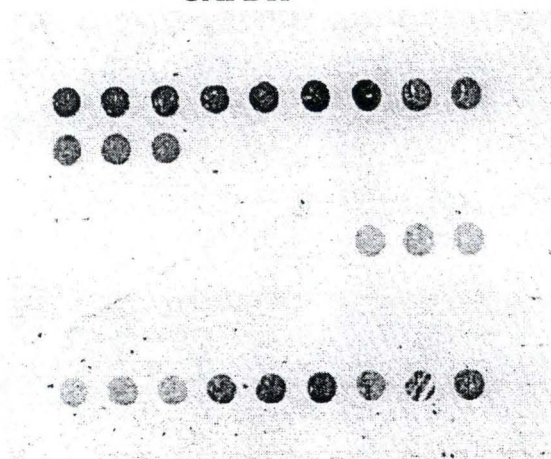
Intégrine alpha V



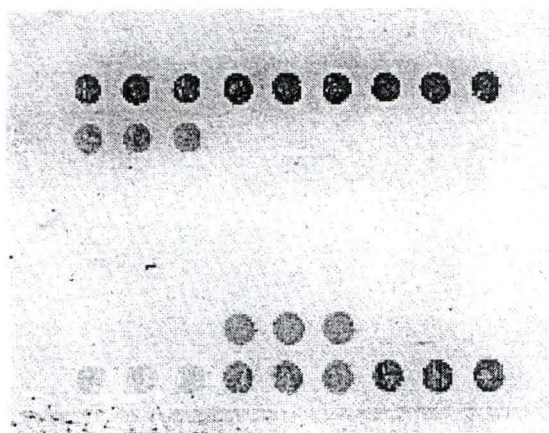
Tubuline alpha



GAPDH



iPLA2



FigIII.22 : Résultats de l'hybridation des cibles intégrine alpha V, tubuline alpha, GAPDH et iPLA2 sur les trappeurs respectifs.



De plus, nous avons spotté des trappeurs de HIV qui vont servir à hybrider un contrôle positif de reverse transcription. Ce contrôle positif est un ARN HIV portant une queue de poly A. Cet ARN sera ajouté à chaque population d'ARNm extraits à partir de nos cellules. Lors de la transcription inverse, cet ARN de HIV sera retrotranscrit en cDNA et sera marqué avec des biotines. Si la transcription inverse a fonctionné, nous aurons donc un signal d'hybridation sur les trappeurs de HIV.

Les lignes suivantes correspondent à 3 répliquats de chacun des 12 trappeurs obtenus à partir des clones (cfr. Matériel et méthodes point 12.2.1). Ceci est illustré dans la Fig.III.20. Ce damier servira à tester la spécificité de notre chips et de voir si chaque cible s'hybride bien sur ses trappeurs respectifs.

### **5.3 Production de cibles biotinylées utilisables en hybridation**

Des ADN cibles multibiotinylés ont été amplifiés par une paire d'amorces (une amorce sens et une amorce anti-sens spécifique de la taille de chaque cible) à partir des clones obtenus. Ces cibles multibiotinylées seront utilisées pour tester l'hybridation. Ceci a été réalisé pour les gènes suivant : endothéline-1, GAPDH, Intégrine alpha V, iPLA2, IL-8 et tubuline-alpha. Pour chacun de ces gènes, nous n'obtenons qu'une seule bande d'environ 400 pb correspondant à la cible biotinylée. Les résultats de production de cibles biotinylées pour 5 gènes sont illustrés à la Fig.III.21. Il n'était pas nécessaire de produire ces cibles pour tous les gènes d'intérêt car celle-ci vont uniquement servir, dans un premier temps, à tester la spécificité de l'hybridation pour un nombre limité de gènes. Dans la suite du travail, nous utiliserons pour l'hybridation un produit de RT marqué avec des biotines et contenant donc une population de cDNA différents.

### **5.4 Mesure de la spécificité d'hybridation sur les damier du point 1.11**

Cette hybridation a été réalisée dans le but de vérifier la spécificité de l'outil. L'hybridation a été réalisée à 65°C pendant 2 heures.

Les résultats obtenus montrent que les contrôles de fixation et d'hybridation positif et négatif donnent les résultats attendus. Ceci est illustré à la Fig.III.22 pour les hybridations des cibles intégrine alphaV, tubuline-alpha, GAPDH et iPLA2. Ces résultats montrent aussi que la chips mise au point est spécifique pour ces 4 gènes. En effet, chacune des cibles se fixe sur son trappeur respectif. On constate aussi que les trappeurs de 400 pb permettent une efficace et que le bruit de fond est très faible. Ce qui confirme les résultats obtenus à la Fig.III.18.

En conclusion, nous pouvons dire que la chips mise au point est optimisée et qu'elle est spécifique. Nous pouvons dès lors l'utiliser non plus



pour hybrider des cibles pures biotinylées, mais bien pour hybrider des ADNc obtenus à partir d'une population d'ARNm extraite de cellules.

## II. Utilisation de la chips

La chips mise au point étant optimisée, nous pouvons dès à présent l'utiliser afin de comparer l'expression génique entre cellules contrôles (saines) et cellules stimulées à l'IL-1 ou aux  $\beta$ VLDL. En effet, au laboratoire, A.-C. Huet et M.Martin ont montré que lorsqu'on incube les cellules avec des  $\beta$ -VLDL, lipoprotéine athérogène majeure chez la souris, elles s'activent et deviennent plus collantes pour les monocytes, ce qui favorise la diapédèse qui est considérée comme un événement précoce dans la mise en place des lésions. Une première expérience d'hybridation a été réalisée afin de tester une première fois notre chips finalisée.

Pour ce faire, nous avons extrait de l'ARNm de 10 millions de cellules contrôles ainsi que l'ARNm de 10 millions de cellules stimulées à l'IL-1 à 10ng/ml pendant 6 heures. Ces deux populations d'ARNm ont été quantifiées et nous obtenons 1  $\mu$ g d'ARNm pour chaque population. Ces 2 lots d'ARNm sont alors retrotranscrits en présence de UTP-biotinylés pour obtenir 2 populations de cDNA marqués. Ces populations de cDNAs sont ensuite hybridées sur 2 damiers décrits précédemment au point 5.2 pendant 2 heures à 65 °C. La révélation s'est faite par précipitation à l'argent. Les résultats sont à la figure III.23.

Les résultats obtenus sur ce damier montrent que les contrôles de fixation inférieurs et les contrôles d'hybridation positifs s'allument et que les contrôles d'hybridation négatifs ne s'allument pas. Par contre nous remarquons un problème au niveau des contrôles de fixation supérieur du damier qui auraient dû donner des signaux très intenses. Nous avons eu à faire à un problème d'homogénéité de la détection. De plus, nous n'avons obtenu aucune hybridation sur chaque trappeur spécifique des gènes d'intérêt, ce qui signifie qu'il y a un problème au niveau de l'hybridation de notre population de cDNA. Une première hypothèse serait qu'il n'y avait pas assez de matériel au départ. F. De Longueville au laboratoire a montré qu'il lui fallait 2  $\mu$ g d'ARNm de départ pour obtenir des résultats d'hybridations des cDNAs sur des trappeurs de 400bp lors d'une hybridation de 2 heures à 65°C. Nous devrions donc envisager de mettre plus d'ARNm de départ dans les expériences ultérieures. Une autre hypothèse serait que l'ARNm que l'on a voulu rétrotranscrire s'est dégradé. Une dernière hypothèse serait un oubli de notre part, les biotines n'étant peut-être pas présentes dans le produit de RT.

Pour vérifier ces hypothèses, il nous faudra recommencer cette expérience en incluant dans notre population d'ARNm un ARN de HIV nous permettant de



contrôler la qualité de la retrotranscription. Il nous faudra également tester différentes quantités d'ARNm par hybridation.

**Conclusions**  
**et**  
**Perspectives**



### 1. Conclusions

Le but de ce mémoire consistait à développer une chip athérosclérose en modèle murin, afin de suivre l'expression d'une vingtaine de gènes potentiellement impliqués dans l'athérosclérose. Nous avons choisi le modèle murin, vu l'importance croissante des modèles de souris transgéniques et knock-out en recherche dans le domaine de l'athérosclérose. Nous nous sommes limités dans un premier temps à une vingtaine de gènes codant pour des protéines que l'on peut classer en diverses catégories fonctionnelles :

- des protéines d'**adhérence**, qui jouent un rôle dans le phénomène de diapédèse des monocytes vers la subendothéliale et qui constitue l'étape obligée avant leur transformation en macrophages, ces derniers se transformant progressivement en cellules spumeuses accumulant le cholestérol : c'est le cas des protéines CAM (ICAM-1, VCAM-1), de la E-sélectine, de certaines intégrines, ... ;
- des **chimiokines** (IL-8, CSF-1, ...) et **cytokines** (PDGF, FGF-2, ...) qui contribuent à créer le contexte inflammatoire et à recruter les leucocytes, dont les monocytes, et des **facteurs de croissance** (PDGF, FGF-1, ...) qui recrutent les cellules musculaires lisses de la média vers l'intima et induisent leur prolifération dans l'intima ;
- des **enzymes pro-inflammatoires** telles la sPLA2 et la COX-2, contrôlant le métabolisme de l'acide arachidonique et de ses dérivés ;
- des **protéines enzymatiques** (NOSc et NOSi) ou **non enzymatiques** (endothéline) **qui contrôlent le tonus vasculaire** ;
- des protéines de **maintenance** (« house-keeping ») dont l'expression reste stable et qui servent de référence.

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons d'abord mis en œuvre une chip expérimentale, de faible densité. Pour terminer le travail, nous avons voulu la tester sur de l'ARN total de cellules endothéliales murines incubées ou non avec des lipoprotéines athérogènes, les  $\beta$ -VLDL, car celles-ci activent le facteur NF- $\kappa$ B et rendent les cellules endothéliales plus « collantes » pour les monocytes. Le but à plus long terme est de pouvoir comparer l'expression génique de cellules



endothéliales saines avec celle de cellules provenant de lésions athérosclérotiques.

La première partie du travail consistait à construire la chip. Pour chacun des gènes sélectionnés, nous avons trouvé dans les banques de données la séquence complète de l'ARNm et des amorces spécifiques à celle-ci. Par RT-PCR, nous avons obtenu sur de l'ARN extrait de cellules endothéliales de souris en culture, un ADNc qui sera alors amplifié un grand nombre de fois et cloné.

Pour un certain nombre de ces gènes, nous n'avons pu trouver dans les banques de données la séquence d'ARNm chez la souris. Ceci était le cas des ARNm de l'interleukine-8 et du MCP-1 que nous avons trouvé pour l'espèce humaine et de COX-2 que nous avons trouvé chez *Mustela*. Malgré cela nous sommes parvenus à obtenir par RT-PCR des amplicons d'environ 600 pb.

Au cours de ces RT-PCR, nous avons rencontré des difficultés au niveau de l'efficacité et de la spécificité. Les problèmes concernant la spécificité ont pu être résolus en diminuant les concentrations en  $MgSO_4$ , en polymérase, en amorce et en augmentant la température. Ainsi, nous avons pu obtenir des amplicons pour les gènes ICAM-1, NOSc, NOSi, Endothéline-1. Quant aux problèmes d'efficacité, ils ont été résolus de 2 façons. D'une part, les RT-PCR ont été réalisées sur de l'ARN total extrait de cellules qui cette fois-ci ont été stimulées à l'IL-1, car certains gènes tels ceux encodant la COX-2, la NOSi, le MCP-1 et l'IL-8, nécessitent que la cellule soit stimulée afin d'être exprimés. D'autre part, nous avons augmenté la température et la concentration en  $MgSO_4$ . Au total sur 22 gènes sélectionnés, nous avons obtenus des amplicons pour 17 d'entre eux.

Une fois réamplifiés et purifiés, ces amplicons sont alors clonés dans le plasmide pGEM-T easy afin de réaliser des minipréparations d'ADN plasmidique. Nous n'avons pas pu cloner les 17 amplicons obtenus lors des RT-PCR car lors de la mise en culture des bactéries contenant le plasmide, certaines d'entre elles n'ont pas formé de colonies. A ce stade, nous avons donc 31 clones contenant chacun une séquence d'environ 600 pb, spécifique de 12 gènes d'intérêt. Afin de vérifier le clonage, le plasmide a été tout d'abord restreint par EcoRI afin de vérifier la taille de l'insert. Chaque clone contenait effectivement



un insert de taille attendue. Suite à cela, un séquençage a été réalisé sur chaque insert et ceci nous a permis de confirmer que chaque insert avait la séquence attendue. A partir de ces clones, nous avons utilisé les inserts de 600 pb comme matrice pour générer par PCR interne des ADN trappeurs de tailles variables (200, 400 et 600 pb) afin d'optimiser l'étape d'hybridation des ADN cibles. Ceci n'a été réalisé que pour les amplicons correspondants à ICAM-1 et VCAM-1. L'hybridation s'est révélée spécifique pour chaque trappeur. Les amorces de 25 pb n'ont permis aucune hybridation et nous avons montré que les trappeurs de 400 pb à une concentration de 150 nM s'hybridaient de façon plus efficace, à une température de 65 °C.

La dernière étape de l'optimisation de cette chip consistait alors à produire des trappeurs de 400 pb pour les 10 autres gènes, afin de mesurer la spécificité de l'outil. l'ensemble des étapes de production de l'outil est repris dans un tableau récapitulatif (Tableau IV.1).

En conclusion, nous pouvons dire que la chip mise au point est optimisée et qu'elle est spécifique pour chacun des gènes.

Dès lors, nous sommes passés à la seconde partie du travail qui consistait à utiliser cette chip. Pour cela, du cDNA, obtenu à partir d'ARNm issu de cellules contrôles ou de cellules endothéliales murines incubées in vitro en présence de  $\beta$ -VLDL (ou d'IL-1, utilisée comme contrôle positif), a été hybridé sur notre chip afin de déterminer l'effet des  $\beta$ -VLDL sur l'expression des gènes sélectionnés sur la chip. Malheureusement, nous n'avons obtenu aucune hybridation. Ce problème peut être dû soit à la quantité d'ARN de départ, celle-ci étant trop faible, soit à la qualité de l'ARN celui-ci s'étant peut-être dégradé. Cette manipulation est dès lors à recommencer. En effet, un travail de mise au point similaire, mais dans une problématique biologique fort différente, a été mené avec succès par une autre équipe du laboratoire : dans ce cas, il s'agissait de mesurer l'expression génique d'hépatocytes de rat soumis à des molécules toxiques. La mesure d'expression est réalisée au niveau des ARNm et cette chip vise 50 gènes, encodant des enzymes de biotransformation, dont plusieurs isoformes du cytochrome P450. Il s'agit de trappeurs de 400 pb fixés sur la chip à une concentration de 300 nM. Cette équipe a montré qu'il valait mieux



travailler avec des ARNm plutôt que des ARN totaux et que la quantité minimale nécessaire pour obtenir des signaux en hybridation était de 2µg.

## 2. Perspectives

Il faudra donc dans un premier temps, recommencer une expérience en comparant des cellules stimulées ou non avec de l'IL-1, qui est reconnue pour induire plusieurs gènes couverts par la chip. Si nous parvenons à obtenir des résultats concluants, nous pourrions définir exactement les conditions expérimentales requises, dont le matériel cellulaire nécessaire. On pourra alors tester l'influence des  $\beta$ -VLDL sur l'expression des gènes d'intérêt. Il faut savoir que ces  $\beta$ -VLDL sont prélevées à partir de souris knock-out ApoE<sup>-/-</sup> à la KUL : les quantités de  $\beta$ -VLDL disponibles ne sont pas illimitées et il faut programmer l'élevage de ces souris en fonction des quantités de  $\beta$ -VLDL qui seront requises pour les expériences à venir. En cas de succès, la chip devrait tout d'abord nous aider à mieux comprendre les mécanismes d'activation des cellules endothéliales par les lipoprotéines athérogènes et ce, en parallèle avec les gels à deux dimensions. Cette approche serait ainsi complémentaire aux autres travaux du laboratoire étudiant l'adhérence des monocytes sur les cellules endothéliales, ce qui favorise le processus de diapédèse, ainsi que l'activation du facteur NF $\kappa$ B. En effet, les protéines d'adhérence impliquées ne sont pas encore complètement identifiées et les mécanismes moléculaires conduisant à l'activation du facteur NF- $\kappa$ B dans les cellules incubées en présence de  $\beta$ -VLDL restent méconnus (Heller et al, 1996).

Dans un second temps, il s'agira d'augmenter le nombre de trappeurs différents sur la chip, en intégrant les données récentes de la littérature sur l'athérosclérose.

A plus long terme, il y a un espoir d'appliquer la biochip à l'étude de l'expression des cellules endothéliales dérivées de lésions chez des souris knock-out pour l'apoprotéine E, qui développent des lésions précoces spontanément. Mais ceci n'est pas évident du fait qu'il faut au préalable passer



par une phase d'amplification des cellules endothéliales en primoculture. Des expériences préliminaires sont actuellement en cours au laboratoire.

Mais la chip « athérosclérose » en modèle murin, pourrait présenter un intérêt nouveau, en ce sens qu'elle pourrait faire partie d'une batterie de tests fonctionnels (comprenant également les tests d'activation du facteur NF- $\kappa$ B), pour estimer si des lipoprotéines sont capables ou non d'activer des cellules endothéliales, ces lipoprotéines étant préparées à partir d'animaux ayant subi soit des diètes, soit des traitements médicamenteux, soit des transferts de gènes. C'est ce dernier cas que nous allons illustrer.

Quarck et al. (article soumis), dans le cadre du projet PAI, dans lequel s'inscrit ce mémoire, ont récemment transféré via un vecteur adénoviral, le gène encodant la PAF-acétyl hydrolase (PAF-AH) dans des souris knock-out pour l'ApoE. Pour rappel, ces souris constituent un modèle expérimental bien reconnu, d'athérosclérose chez la souris. La PAF-AH, a deux activités catalytiques :

- d'une part une activité PLA<sub>2</sub>, qui lui permet d'hydrolyser au sein des lipoprotéines, les phosphatidylcholines dont les chaînes d'acides gras sont oxydées (Steinbrecher et al, 1989) ;
- d'autre part, l'activité PAF-acétyl hydrolase, qui neutralise le PAF, médiateur pro-inflammatoire bien connu.

Cette enzyme est produite principalement par les monocytes/macrophages, les plaquettes, les érythrocytes, la rate et les hépatocytes (Stafforini et al, 1987). Elle est associée en majeure partie chez l'homme aux LDL et HDL (Tselepis et al, 1995) et chez la souris aux HDL (Tsaoussis et al, 1994).

Quarck et al (article soumis) constatent que le transfert du gène encodant la PAF-AH prévient la formation d'une néo-intima, dans un modèle de lésions induites par dénudation locale de l'endothélium au niveau de la carotide. Ces résultats sont tout à fait originaux et prometteurs. On peut en conclure, que pour augmenter le pouvoir athéro-protecteur des HDL, on peut procéder de 2 façons :

- soit en augmentant leurs concentrations plasmatiques, ce qui est observé dans des souris transgéniques surexprimant l'Apo AI, l'apoprotéine majeure structurant les HDL (Fruchart et Duriez, 1998);
- soit en augmentant leur pouvoir protecteur sans affecter leurs concentrations plasmatiques. C'est ce qu'ont observé Quarck et al. (article soumis).



Une des perspectives immédiates de ce mémoire sera de tester les  $\beta$ -VLDL provenant de souris ApoE<sup>-/-</sup>, ayant subi ou non un transfert par vecteur adénoviral du gène de la PAF-AH. Ces  $\beta$ -VLDL seront d'abord testées sur les cellules endothéliales murines en culture, grâce aux tests d'adhérence des monocytes (comme décrit à la Fig.I.8 dans l'Introduction) et aux tests déterminant l'activation du facteur NF- $\kappa$ B (voir Fig.I.10 dans l'Introduction). Si une différence est décelée, nous testerons alors les 2 préparations de  $\beta$ -VLDL, sur la chip développée dans ce mémoire.

Enfin, si la recherche en athérosclérose, recourt de plus en plus aux modèles murins, étant donné l'essor des souris knock-out et transgéniques et vu le développement de méthodes de transferts de gènes *in vivo*, il n'en demeure pas moins vrai que l'athérosclérose est d'abord une maladie touchant l'homme. On peut donc également à moyen terme envisager une chip « athérosclérose » pour l'homme. Il faut savoir que l'URBC a acquis une banque de cDNA humains vérifiés par séquençage. Cela signifie, que la phase de production des trappeurs pourrait être plus rapide dans ce cas. Le choix des gènes dont on voudrait suivre l'expression serait également à adapter, car les cellules cibles dont on voudrait suivre le pattern d'expression chez des personnes saines et chez des personnes à risque pour un problème cardio-vasculaire, ne seraient plus les cellules endothéliales, mais bien les monocytes circulants, accessibles par une simple prise de sang. On sait déjà qu'une incubation avec des LDL oxydées aurait pour effet de stimuler l'expression de gènes impliqués dans la différenciation des monocytes (Hiltunen et al, 1999). En outre, il semblerait que les monocytes circulants deviendraient progressivement actifs de manière constitutive, avec activation basale du facteur NF- $\kappa$ B, ce qui n'est pas le cas de monocytes provenant de donneurs sains (Dr. M. Ritchie, communication personnelle). On peut donc imaginer à plus long terme développer et affiner des tests diagnostics dans le domaine cardiovasculaire, en ayant recours à une chip adaptée.



# **Bibliographie**

**Bellis M. and Casellas P.**

La puce ADN : un multi-réacteur de paillasse.

*Médecine/Sciences* (1997) 13 : 1317-1324

**Bobryshev Y.V., Cherian S.M., Inder S.J. and Lord R.S.A.**

Neovascular expression of VE-cadherin in human atherosclerotic arteries and its relation to intimal inflammation.

*Cardiovascular Res.* (1999) 43 : 1003-1017

**Brashers V.L., Haak S.W. and Richardson S.J.**

Alterations of Cardiovascular Function

*In Pathobiology : The Biologic Basis for Disease in Adults and Children*

*McCance K.L. and Huether S.E. (3<sup>e</sup> edition) (1997) : 1024-1029*

**Brown P.O. and Botstein D.**

Exploring the new world of the genome with DNA microarrays.

*Nature Genetics* (1999) 21 (supplement) : 33-37

**Cheung V.G., Morley M., Aguilar F ;, Massimi A., Kucherlapati R. and Chlids G.**

Making and reading microarrays.

*Nature Genetics* (1999) 21 (supplement) : 15-19

**Cole K.A., Krizman D.B. and Emmert-Buck M.**

The genetics of cancer – a 3D model.

*Nature Genetics* (1999) 21 (supplement) : 38-41



**Collins F.S.**

Microarrays and macroconsequences

*Nature Genetics* (1999) 21 (supplement) : p.2

**Collins T.**

Element of vascular Pathobiology

*In Cellular and Molecular Pathogenesis, edited by A. E.Sirica, Lippincott-Raven Publishers* (1996) 125-155

**Debouck C. and Goodfellow P.N.**

DNA microarrays in drug discovery and development.

*Nature Genetics* (1999) 21 (supplement) : 48-50

**Demuth K., Myara I. and Moatti N.**

Biologie de la cellule endothéliale et athérogenèse.

*Ann. Biol. Clin.* (1995) 53 : 171-191

**Duggan D.J., Bittner M., Chen Y., Mektzer P. and Trent J.M.**

Expression profiling using cDNA microarrays.

*Nature Genetics* (1999) 21 (supplement) : 10-14

**Eckey R., Menschikowski M., Lattke P. and Jaross W.**

Minimal oxidation and storage of low density lipoproteins results in an increased susceptibility to phospholipid hydrolysis by phospholipase A<sub>2</sub>.

*Atherosclerosis* (1997) 132(2) : 165-176

**Elinder L.S., Dumitrescu A., larsson P ., Hedin U., Frostegard J. and Claesson H.E.**

Expression of phospholipase A<sub>2</sub> isoforms in human normal and atherosclerotic arterial wall.

*Arterioscler. Thromb . Vasc . Biol.* (1997) 17(10) : 2257-2263

**Fruchart J.C. and Duriez P.**

High density lipoproteins and coronary heart disease. Future prospects in gene therapy.

*Biochimie* (1998) 80 : 167-172

**Gotoh M., Hasegawa Y., Shinoara Y., Simizu M.and Tosu M.**

A new approach to determine the effect of mismatches on kinetic parameters in DNA hybridization using an optical biosensor.

*DNA Res.* (1995) 2 : 285-293

**Hacia J.G.**

Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays.

*Nature Genetics* (1999) 21 (supplement) : 42-47

**Hacia J.G., Brody L. C., Chee M. S., Fodor S.P.A. and Collins F.S.**

Detection of heterogenous mutations in BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two-colours fluorescence analysis.

*Nature Genetics* (1996) 14 : 441-445

**Heller R.A., Schena M., Chai A., Shalon D., Bedilion T., Gilmore J., Wooley D.E., and Davis R.W.**

Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays.

*Proc. Natl. Sci. USA.* (1997) 94 : 2150-2155



**Hengen P.N.**

Quantitative PCR : an accurate measure of mRNA ?

*TIBS (1995) 20 : 474-477*

**Henry C.M.**

DNA microarrays in toxicology.

*Analytical Chemistry News & Features (1999) 462-464*

**Hiltunen M.O., Niemi M. and Ylä-Herttuala.**

Functional genomics and DNA array techniques in atherosclerosis research.

*Current Opinion in Lipidology (1999) 10 : 515-519*

**Hingray J .**

Les puces à ADN

*Le technoscope, cahier n°91, Biofutur (1997, 21avril)*

**KitaT, Kume N., Ishii K., Horiuchi H, Arai H. and Yokode M.**

Oxidized LDL and expression of monocyte adhesion molecules.

*Diabetes Res. Clin. Pract. (1999) 45 : 123-126*

**Lander E.S.**

Array of hope

*Nature Genetics (1999) 21 (supplement) : 3-4*

**Lockhart D.J., Done H.L., Byrne M.C., Folleste M.T., Gallo M.V., Chee M.S., Mittman M., Wang C.W., Kobayashi M., Horton H. and Brown E.L.**

Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays.

*Nature Biotech (1996) 14 : 1675-1680*

**Mahley W.**

Development of Accelerated Atherosclerosis.

*Arch. Pathol. Lab. Med* (1983) 107 : 393-399

**Maskos U. and Southern E.M.,**

A study of oligonucleotide reassociation using large arrays of oligonucleotides synthesised on a glass support.

*Nucleic Acids Res.* (1993) 21 : 1368-1373

**Menschikowski M., Kasper M., Schiering A., Schiefers S., Stockinger H., and Jaross W.**

Secretory Group II phospholipase A<sub>2</sub> in human atherosclerotic plaques.

*Atherosclerosis* (1995) 118 : 173-181

**Mészáros M. and Morton D.**

Subtractive Hybridization Strategy Using Paramagnetic Oligo (dT) Beads and PCR

*Biotechniques* (1996) 20 : 413-419

**Murakami M., Nakatani Y., Atsumi G., Inoue K. and Kudo I.**

Regulatory Functions of Phospholipase A<sub>2</sub>.

*Critical Review of Immunology* (1997) 17 : 225-283

**Peccoud J.**

La PCR quantitative : un nouvel outil pour l'analyse médicale.

*Médecine/Sciences* (1993) 2 : 1378-1385

**Rader D. and Fitzgerald G.**

State of the art : Atherosclerosis in a limited edition

*Nature Medicine* (1998) 4 : 899-900



**Raines E.W. and Ross R.**

Multiple growth factors are associated with lesions of atherosclerosis :  
specificity or redundancy ?

*BioEssays* (1996) 18 : 271-282

**Ramsay G.**

DNA chips : State-of-the art

*Nature biotechnology* (1998) 16 : 40-44

**Ross R.**

The pathogenesis of atherosclerosis : a perspective for the 1990s

*Nature* (1993) 362 : 801-809

**Schena M.**

Genome analysis with gene expression microarrays.

*BioEssays* (1996) 18 n°5, 427-431

**Southern E., Mir K. and Shchepinov M.**

Molecular interactions on microarrays.

*Nature Genetics* (1999) 21 (supplement) : 5-8

**Stafforini D.M., Prescott S.M. and Zimmermann G.A.**

Platelet-activating factor acetylhydrolase in human tissue and blood cells

*Lipids* (1991) 26 : 979-985

**Steinbrecher U.P. and Pritchard P.H.**

Hydrolysis of phosphatidylcholine during LDL oxidation is mediated by  
platelet-activating factor acetylhydrolase.

*J. Lipid Research* (1989) 30 : 305-315

**Stevens A . and Lowe J.**

Anatomie Pathologique Générale et Spéciale

*Edition Deboek Université (1997) pp.536*

**Tsaoussis V. and Vakirti-Lemonias C.**

The mouse plasma PAF acethylhydrolase : II. It consists of two enzymes both associated with the HDL.

*J. Lipid Mediat. Cell Signal (1994) 9 : 317-331*

**Tselepis A.D., Dentan C. and Karabina S.A.**

PAF-degrading acethylhydrolase is preferentially associated with dense LDL and VHDL-1 in human plasma. Catalytic characteristics and relation to the monocyte-derived enzyme.

*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. (1995) 15 : 1764-1773*

**Voet D and Voet J.G.**

Biochimie

*Edition Deboek Université (1998) pp. 1361*

**Zammatteo N., Jeanmart L., Hamels S., Courtois S., Louette P., Hevesi L. and Remacle J.**

Comparison between Different Strategies of Covalent Attachment of DNA to Glass Surfaces to Build DNA Microarrays

*Analytical Biochemistry (2000) 280 : 143-150*